Junqueira
Carneiro

Biologia Celular e Molecular

Nona edição

1 Introdução: Visão Panorâmica sobre a Estrutura, as Funções e a Evolução das Células

Roteiro

- Para sua multiplicação, os vírus, estruturas que não são constituídas por células, usam a maquinaria sintética das células que parasitam para produzir macromoléculas virais
- Há apenas dois tipos celulares básicos: as células procariontes e as eucariontes
- As células procariontes não têm núcleo - o genoma é separado do citoplasma por um envoltório - e, geralmente, não apresentam membranas que dividem o citoplasma em compartimentos
- As bactérias do grupo das riquétsias e clamídias são células procariontes incompletas, que se multiplicam somente dentro das células completas (células eucarionte)
- As células eucariontes são maiores, estruturalmente mais complexas e contêm muito mais DNA; seus cromosso-mos são complexos, contêm numerosas proteínas, inclusive histonas, e ficam separados do citoplasma por uma membrana dupla, que contém poros, denominada envoltório nuclear
- O citoplasma das células eucariontes é dividido por membranas em compartimentos que contêm moléculas dis-tintas e que executam funções especializadas em cada compartimento, aumentando muito a eficiência dessas células. O citoplasma das procariontes é muito pobre em membranas, que não formam compartimentos funcio-nais
- As células eucariontes das plantas, geralmente, apresentam um grande vacúolo citoplasmático, têm plastos e parede de celulose, armazenam amido como reserva energética e se comunicam por meio de plasmodesmos. Nas células eucariontes, a reserva energética principal é o glicogênio
- Cloroplastos e mitocôndrias provavelmente se originaram de bactérias simbiontes que se estabeleceram de modo definitivo no citoplasma
- Os seres vivos podem ser agrupados em cinco grandes grupos ou reinos: moneras, protistas, plantas, fungos e animais
- Estudos filogenéticos moleculares, fundamentados principalmente no RNA ribossômico, separam os seres vivos em apenas três grandes grupos ou domínios: bactéria, árquea e eucária. Os dois primeiros domínios são constituí-dos por células procariontes; apenas o domínio eucária apresenta células eucariontes.

Neste capítulo será apresentada uma visão panorâmica da estrutura, das funções e da evolução das células, que servirá de base para o estudo da matéria que será tratada mais minuciosamente nos capítulos seguintes.

A célula é a unidade que constitui os seres vivos, podendo existir isoladamente, nos seres unicelulares, ou formar arran-jos ordenados, os tecidos, que constituem o corpo dos seres pluricelulares. Em geral, os tecidos apresentam quantidades variáveis de material extracelular, produzido por suas células.

Vírus são parasitos intracelulares obrigatórios

Em razão de suas relações com as células e seus efeitos sobre elas, podendo causar doenças de gravidade variável, os vírus serão estudados neste livro, embora de modo resumido (Capítulo 16). Um vírus não é capaz de se multiplicar, exceto quando parasita uma célula de cujas enzimas se utiliza para a síntese das macromoléculas que irão formar novos vírus. Eles não contam com todas as enzimas nem as estruturas necessá-rias para a fabricação de outros vírus; são, portanto, parasitos intracelulares obrigatórios. Na verdade, os vírus são parasitos moleculares, uma vez que induzem a maquinaria sintética das células a sintetizar as moléculas que irão formar novos vírus em vez de produzirem moléculas para a própria célula.

Os vírus que atacam as células animais não atacam as vege-tais, e vice-versa. Distinguem-se, pois, os vírus animais e os vírus wegetais. Há, porém, alguns vírus vegetais que, invadindo-as multiplicam-se nascélulas de insetos disseminadores desses vírus de uma planta para outra. Os vírus das bactérias são chamados bacteriófagos, ou simplesmente fagos.

Cada vírus é formado basicamente por duas partes:

- uma porção central, que leva a informação genética, isto é, um genoma constituído, conforme o vírus, de um filamento simples ou duplo de ácido ribonucleico ou desoxirribonucleico, no qual estão contidas, em código, todas as informações necessárias para a produção de outros vírus iguais
- uma porção periférica, constituída de proteínas, que pro-tege o genoma, possibilita ao vírus identificar as células que ele pode parasitar e, em determinados vírus, facilita a pene-tração nas células.

Alguns vírus maiores e mais complexos apresentam um invólucro lipoproteico. A parte lipídica desse invólucro origina-se das membranas celulares; mas as proteínas são de natureza viral, isto é, são codificadas pelo ácido nucleico do vírus. No exterior das células, os vírus se apresentam como partículas constituídas de um agregado de macromoléculas e recebem a denominação de vírions.

Riquétsias e clamídias são células incompletas e, por essa razão, só proliferam no interior de uma célula completa

As bactérias dos grupos das riquétsias e das clamídias são muito pequenas e constituídas por células procariontes incompletas, que não têm a capacidade de autoduplicação independente da colaboração de outras células. Como os vírus, as riquétsias e clamídias são parasitas intracelulares obrigatórios, pois só proliferam no interior das células completas; todavia, as células incompletas diferem dos vírus em dois aspectos fundamentais. *Em primeiro lugar*, os vírus carregam, codificada no seu ácido nucleico, a informação genética para a formação de novos vírus, mas não contêm organelas e, por isso, utilizam-se da maquinaria das células para se multiplicar. As células incompletas, ao contrário, têm parte da máquina de síntese para reproduzir-se, mas necessitam da suplementação fornecida pelas células parasitadas. *Em segundo lugar*, as células incompletas têm uma membrana semipermeável, através da qual ocorrem trocas com o meio, o que não acontece com os vírus. O invólucro que alguns vírus têm, e que é constituído principalmente por moléculas celulares, perde-se quando esses vírus penetram nas células.

Provavelmente, as células incompletas são células "degeneradas", isto é, que, no correr dos anos, perderam parte do seu DNA, de suas enzimas e, portanto, sua autonomia, tornando-se dependentes das células que se conservaram completas.

Há apenas dois tipos básicos de células: procariontes e eucariontes

*A microscopia eletrônica demonstrou que existem fun*damentalmente duas classes de células: as procariontes (*pro*, primeiro, e *cario*, núcleo), cujos cromossomos não são separados do citoplasma por membrana, e as eucariontes (*eu*, verdadeiro, e *cario*, núcleo), com um núcleo bem individualizado e delimitado pelo envoltório nuclear. Como será visto a seguir, embora a complexidade nuclear seja utilizada para nomear as duas classes de células, há outras diferenças importantes entre procariontes e eucariontes.

Células procariontes são "pobres" em membranas

As células procariontes caracterizam-se pela escassez de membranas. Nelas, geralmente a única membrana existente é a membrana plasmática. Ao contrário das células eucarion-tes, as procariontes não contêm membranas que separam os cromossomos do citoplasma. Os seres vivos que têm célu-las procariontes são denominados procariotas; essas células constituem as bactérias (as cianofíceas, ou algas azuis, também são bactérias).

A célula procarionte mais bem estudada é a bactéria *Escherichia coli* (Figura 1.1), que, por sua simplicidade estrutural e rapidez de multiplicação, revelou-se excelente para estudos de biologia molecular. A *E. coli* tem a forma de bastão, com cerca de 2 μm de comprimento, e é separada do meio externo por uma membrana plasmática semelhante à que envolve as células eucariontes. Por fora dessa membrana existe uma parede rígida. Conforme a bactéria, a espessura dessa parede é muito variável. Ela é constituída por um complexo de proteínas e glicosaminoglicanas. A parede bacteriana tem, sobretudo, função protetora.

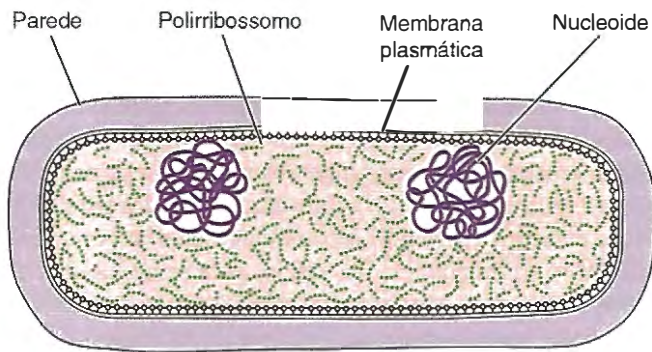



Figura 1.1 ▪ Célula procarionte (bactéria *Escherichia coli*). A célula é envolvida por uma parede rígida presa à membrana plasmática. Na face interna da membrana, encontram-se enzimas relacionadas com a respiração e que estão representadas, no desenho, por pequenas raquetas. O citoplasma contém numerosos polirribossomos, mas não apresenta o sistema de membranas que existe nas células eucariontes. O desenho mostra dois cromossomos, que são idênticos, e, neste exemplo, prendem se à membrana plasmática. A região ocupada pelo cromossomo chama-se nucleoide.

No citoplasma das bactérias existem ribossomos ligados a moléculas de RNA mensageiro (mRNA), constituindo polirribossomos. Encontram-se, em geral, dois ou mais cromossomos idênticos, circulares, ocupando regiões denominadas nucleoides e, muitas vezes, presos a pontos diferentes da membrana plasmática. Cada cromossomo, constituído de DNA e proteínas tem espessura de 2 nm e comprimento de 1,2 mm. As células procariontes não se dividem por mitose, e seus filamentos de DNA não sofrem o processo de condensação que leva à formação de cromossomos visíveis ao microscópio óptico, durante a divisão celular.

O citoplasma das células procariontes em geral não apresenta outra membrana além daquela que o separa do meio externo (membrana plasmática). Em alguns casos podem existir invaginações da membrana plasmática que penetram no citoplasma, no qual se enrolam, originando estruturas denominadas mesossomos. Além disso, no citoplasma das células procariontes que realizam a fotossíntese, existem algu-mas membranas, paralelas entre si, e associadas à clorofila ou a outros pigmentos responsáveis pela captação da energia luminosa.

Outra diferença entre a célula procarionte e a eucarionte é a falta de um citoesqueleto nas células procariontes. Nas eucariontes, o citoesqueleto é responsável pelos movimentos e pela forma das células, que, muitas vezes, é complexa. A forma simples das células procariontes, em geral esférica ou em bastonete, é mantida pela parede extracelular, sintetizada no cito-plasma e agregada à superfície externa da membrana celular. Essa parede é rígida e representa também papel importante na proteção das células bacterianas. Na natureza são encontradas populações de bactérias nos mais diversos *habitats*, e a parede é essencial para proteger as células contra os fatores muitas vezes agressivos desses *habitats*.

Todavia, a diferença mais marcante entre as células proca-riontes e as eucariontes é a pobreza de membranas nas procarion-tes. O citoplasma das células procariontes não se apresenta sub-dividido em compartimentos, ao contrário do que ocorre nas células eucariontes, nas quais um extenso sistema de membrana cria, no citoplasma, microrregiões (Figura 1.2) que contêm moléculas diferentes e executam funções especializadas.

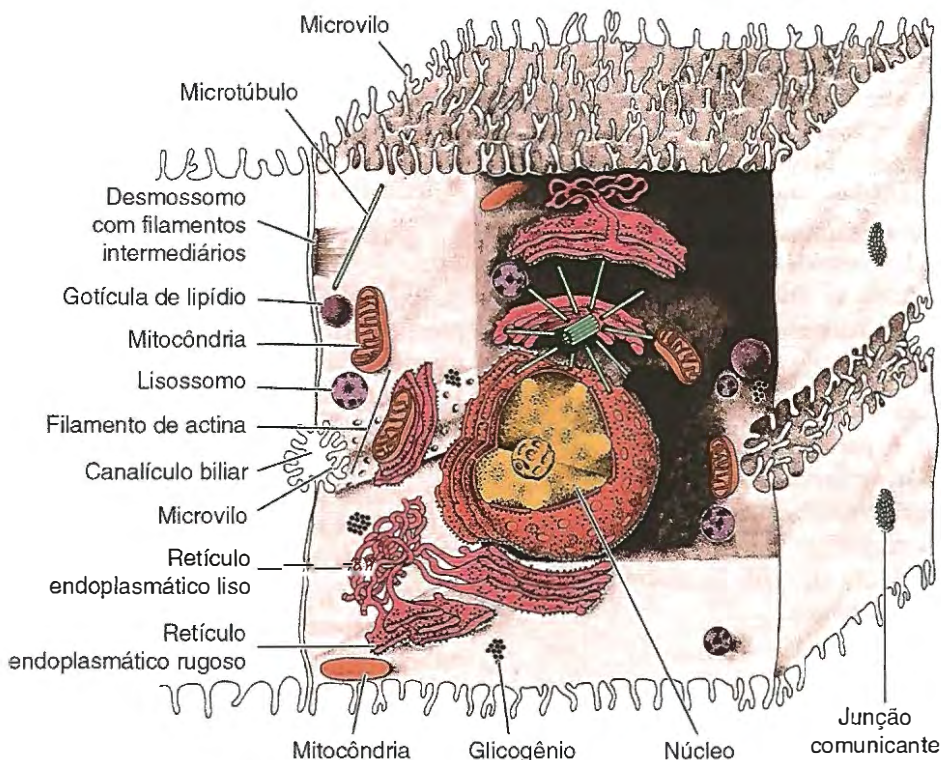



Figura 1.2 ▪ Representação tridimensional de célula eucarionte animal (célula do fígado). O núcleo é separado do citoplasma pelo envelope nuclear, de dupla membrana, com poros. O citoplasma das células eucariontes conta com um sistema de membranas muito desenvolvido e que, por motivos didáticos, só está parcialmente represen-tado nesta figura. Observar, acima do núcleo, um dos dois centríolos da célula, de onde irradiam microtúbulos. Atrás dos centríolos está o aparelho de Golgi. No centro do núcleo aparece o nucléolo. (Reproduzida, com autorização, de Carneiro, J.: Bases Celulares para a Fisiopatologia. *In:* Marcondes, M. *et al Clínica Médica*, 3ª ed. Guanabara Koogan, 1984.)

Células eucariontes são compartimentadas

Essas células apresentam duas partes morfologicamente bem distintas – o citoplasma e o núcleo –, entre as quais existe um trânsito constante de moléculas diversas, nos dois senti-dos. O citoplasma é envolvido pela membrana plasmática, e o núcleo, pelo envoltório nuclear.

Característica importante das células eucariontes é sua riqueza em membranas (Figura 1.2), formando comparti-mentos que separam os diversos processos metabólicos gra-ças ao direcionamento das moléculas absorvidas ou produ-zidas nas próprias células. Além disso, há grandes diferenças enzimáticas entre as membranas dos vários compartimentos. A célula eucarionte é como uma fábrica organizada em seções de montagem, pintura, embalagem etc. Além de aumentar a eficiência, a separação das atividades permite que as células eucariontes atinjam maior tamanho, sem prejuízo de suas funções.

O citoplasma é constituído por matriz, organelas e depósitos diversos

O citoplasma das células eucariontes contém as organe-las, como mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomos e peroxissomos. O conceito de organela não é bem definido; varia um pouco de um autor para outro. Alguns consideram organelas apenas as estruturas envolvidas por membrana, como as mitocôndrias e os lisossomos, por exemplo; outros admitem como organelas todas as estruturas intracelulares presentes em todas as células e que desempenham funções bem definidas, mesmo que não sejam delimitadas por membrana (p. ex.: centrossomos, corpúsculos basais dos cílios). Além das organelas, o citoplasma pode apresentar depósitos de substâncias diversas, como grânulos de glicogênio e gotículas lipídicas. Preenchendo o espaço entre as organelas e os depósi-tos, também chamados inclusões, encontra-se a matriz citoplas-mática ou citosol. O citosol contém água, íons diversos, aminoá-cidos, precursores dos ácidos nucleicos, numerosas enzimas, incluindo as que realizam a glicólise anaeróbia (Capítulo 4) e as que participam da degradação e síntese de hidratos de car-bono, de ácidos graxos, de aminoácidos e de outras moléculas importantes para as células. O citosol contém microfibrilas, constituídas de actina, e microtúbulos, constituídos de tubu-lina, cujas unidades monoméricas se podem despolimerizar e polimerizar novamente, de modo reversível e dinâmico, o que explica as modificações de sol para gel, e viceversa, observadas no citoplasma. Quando despolimerizadas (separadas umas das outras), as moléculas das proteínas actina e tubulina conferem maior fluidez ao citosol. Quando polimerizadas em microfibri-las e microtúbulos, conferem a consistência de gel à região cito-plasmática em que se encontram.

Membrana plasmática

É a parte mais externa do citoplasma, que separa a célula do meio extracelular, contribuindo para manter constante o meio intracelular, que é diferente do meio extracelular. Apresenta cerca de 7 a 10 nm de espessura e é mostrada nas eletromicro-grafias como duas linhas escuras separadas por uma linha central clara. Essa estrutura trilaminar é comum às outras membra-nas encontradas nas células, sendo, por isso, chamada unidade de membrana ou membrana unitária.

As unidades de membrana são bicamadas lipídicas for-madas principalmente por fosfolipídios e que contêm uma quantidade variável de moléculas proteicas, mais numerosas nas membranas com maior atividade funcional (as proteínas são responsáveis pela maioria das funções da membrana). O folheto externo da bicamada lipídica da membrana plasmática apresenta muitas moléculas de glicolipídios, com as porções glicídicas se projetando para o exterior da célula. Às porções glicí-dicas dos glicolipídios se juntam porções glicídicas das proteí-nas da própria membrana, mais glicoproteínas e proteoglica-nas secretadas, que são adsorvidas pela superfície celular para formar um conjunto denominado glicocálice. Assim, o glico-cálice é uma projeção da parte mais externa da membrana, com apenas algumas moléculas adsorvidas, e não uma camada inteiramente extracelular, como se pensou inicialmente.

Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas esféricas ou, mais frequen-temente, alongadas (Figura 1.2). Nas micrografias eletrôni-cas aparecem constituídas por duas unidades de membrana, sendo a interna pregueada, originando dobras em forma de prateleiras ou de túbulos (Figura 1.3).

A principal função das mitocôndrias é liberar energia gradual-mente das moléculas de ácidos graxos e glicose, provenientes dos alimentos, produzindo calor e moléculas de ATP (adenosina trifosfato). A energia armazenada no ATP é usada pelas células para realizar suas diversas atividades, como movimen-tação, secreção e divisão mitótica. As mitocôndrias participam também de outros processos do metabolismo celular (chama-se metabolismo o conjunto de processos químicos de degradação e síntese de moléculas), muito variáveis conforme o tipo de célula, e que serão estudados em outros capítulos deste livro.

Retículo endoplasmático

No citoplasma das células eucariontes existe uma rede de vesículas achatadas, vesículas esféricas e túbulos que se interco-municam, formando um sistema contínuo, embora apareçam separados nos cortes examinados no microscópio eletrônico. Esses elementos apresentam uma parede formada por uma unidade de membrana que delimita cavidades, as cisternas do retículo endoplasmático (Figura 1.3). As cisternas constituem um sistema de túneis, de forma muito variável, que percorre o citoplasma. Distinguem-se o retículo endoplasmático rugoso, ou granular, e o liso (Figura 1.2).

A membrana do retículo endoplasmático rugoso apresenta os ribossomos na sua superfície voltada para o citosol. Os ribossomos são partículas densas aos elétrons e constituídas de ácido ribonucleico (RNA ribossômico ou rRNA) e proteínas. Os ribossomos das células eucariontes têm um diâmetro de 15

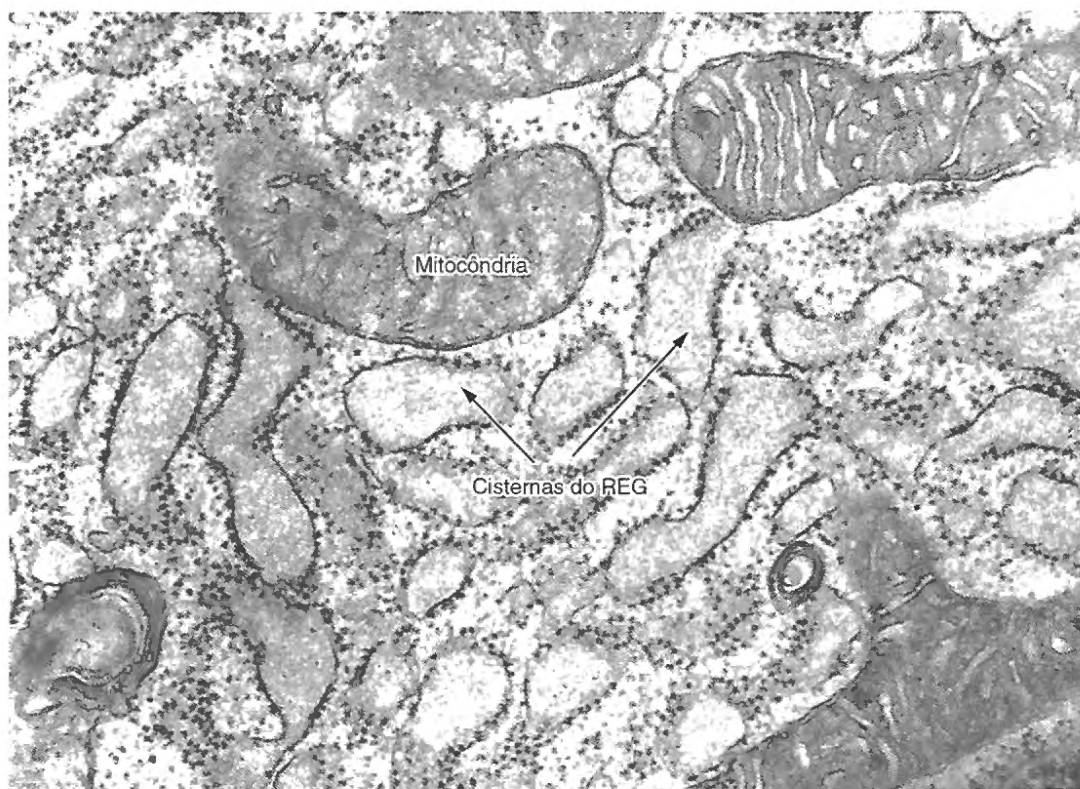



Figura 1.3 • Eletromicrografia de parte do citoplasma de uma célula do tecido conjuntivo (plasmócito). Os corpos mais escuros e alongados são mitocôndrias. Essa cé-lula, especializada na síntese de proteínas, é muito rica em retículo endoplasmático rugoso ou granular (REG). As cisternas estão dilatadas por proteínas sintetizadas pela célula e que serão secretadas no meio extracelular. As proteínas aparecem como um precipitado fino e claro no interior das cisternas do retículo endoplasmático rugoso. Aumento: 60.000x.

a 20 nm, sendo um pouco menores nas células procariontes (bactérias). Cada ribossomo é formado por duas subunidades de tamanhos diferentes, que se associam somente quando se ligam aos filamentos de RNA mensageiro (mRNA).

Como diversos ribossomos se associam a um único filamento de RNA mensageiro (mRNA), formam-se polirribossomos,que ficam dispersos no citoplasma ou presos à superfície externa do retículo endoplasmático rugoso. Os polirribossomos têm papel fundamental na síntese de proteínas.

O retículo endoplasmático liso apresenta-se principalmente como túbulos que se anastomosam (Figura 1.2) e se continuam com o retículo rugoso. O retículo endoplasmático liso é muito desenvolvido em determinados tipos de células, como, por exemplo, nas que secretam hormônios esteroides, nas células hepáticas e nas células da glândula adrenal.

Endossomos

Os endossomos formam um compartimento que recebe as moléculas introduzidas no citoplasma das células pelas vesículas de pinocitose, que se originam da membrana plasmática (Capítulo 5). O compartimento endossomal é constituído de elementos separados; é um sistema extenso, que se vai desde a periferia do citoplasma até as proximidades do núcleo celular. É formado por vesículas e túbulos, cujo interior apresenta pH ácido. Esse compartimento é responsável pela separação e pelo endereçamento do material que penetra no citoplasma pelas vesículas de pinocitose. Grande parte desse material é encaminhada para os lisossomos; porém, muitas moléculas passam dos endossomos para o citosol, e outras são devolvidas para a super-fície celular. Os endossomos podem ser considerados como uma parte da via lisossomal, porque muitas moléculas que se dirigem para os lisossomos passam antes pelos endossomos.

Aparelho de Golgi

Essa organela é também conhecida como zona ou complexo de Golgi, estando constituída por um número variá-vel de vesículas circulares achatadas e por vesículas esféricas de diversos tamanhos, que parecem brotar das primeiras (Figuras 1.2 e 1.4).

Em muitas células, o aparelho de Golgi localiza-se em posição constante, quase sempre ao lado do núcleo (Figuras 1.2 e 1.5); em outras células, ele se encontra disperso pelo citoplasma.

Essa organela apresenta múltiplas funções; mas, dentre elas, cabe destacar que é muito importante na separação e no endereçamento das moléculas sintetizadas nas células, encaminhando-as para as vesículas de secreção (que serão expulsas da célula), os lisossomos, as vesículas que permanecem no citoplasma ou a membrana celular (Capítulo 10).

Lisossomos

Os lisossomos são organelas de forma e tamanho muito variáveis (medem, frequentemente, 0,5 a 3,0 μm de diâmetro [Figuras 1.2 e 1.5]), cujo interior é ácido e contém diversas enzimas hidrolíticas (enzimas que rompem moléculas, adi-

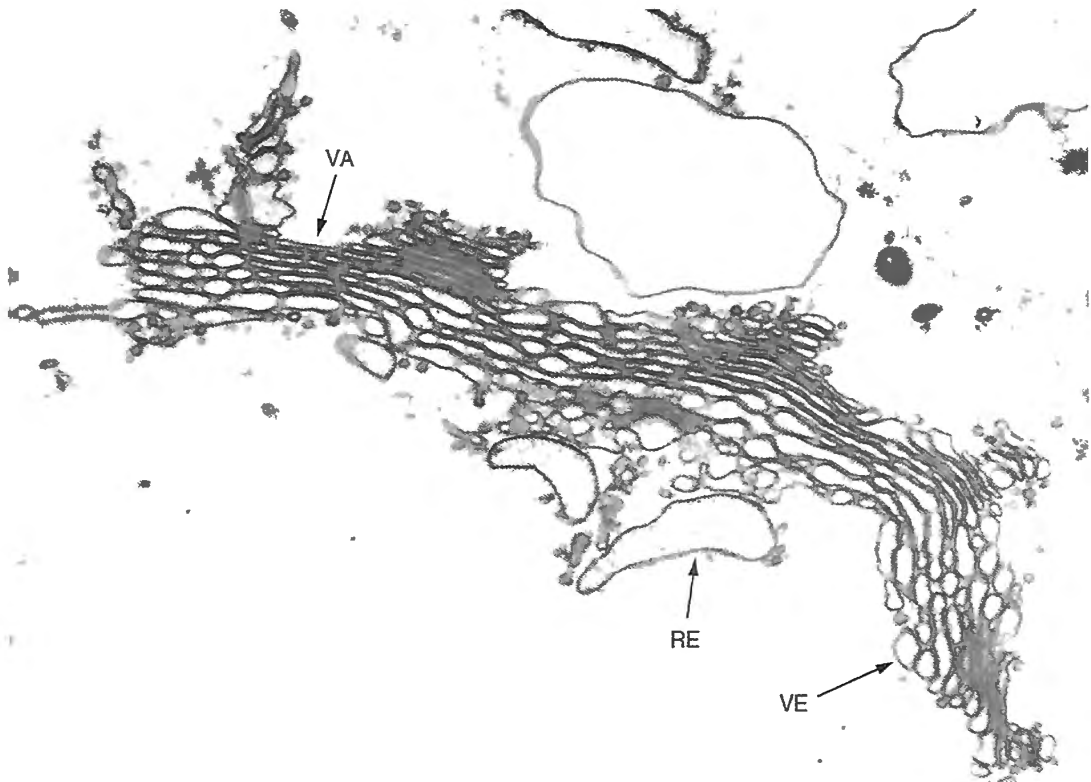



Figura 1.4 ▪ Eletromicrografia do aparelho de Golgi isolado de célula do intestino. Essa organela é constituída de vesículas achatadas (VA) e vesículas esféricas (VE) que parecem brotar daquelas. Notar, também, alguns fragmentos do retículo endoplasmático liso, um dos quais está assinalado (RE). Aumento: 25.000×.

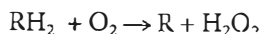
cionando os átomos das moléculas de água). As hidrolases dos lisossomos têm atividade máxima em pH ácido. Essas enzimas são sintetizadas pelos polirribossomos que se prendem ao retículo endoplasmático rugoso. Os lisossomos são depósitos de enzimas utilizadas pelas células para digerir moléculas introduzidas por pinocitose, por fagocitose, ou, então, organelas da própria célula. A destruição e renovação de organelas é um processo fisiológico que permite à célula

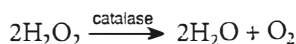
Figura 1.5 ▪ Eletromicrografia de célula do tecido conjuntivo (macrófago). Em alguns pontos, a superfície celular apresenta prolongamentos irregulares. Observar o núcleo (o nucléolo não aparece no corte), o aparelho de Golgi, os lisossomos (L), o retículo endoplasmático liso (REL) e o centríolo. Aumento: 15.000×.

manter seus componentes em bom estado funcional e em quantidade adequada às suas necessidades do momento. As organelas desgastadas pelo uso são eliminadas e substituídas por organelas novas. As que não são mais necessárias são simplesmente removidas.

Peroxissomos

Os peroxissomos são organelas caracterizadas pela presença de enzimas oxidativas que transferem átomos de hidrogênio de diversos substratos para o oxigênio, segundo a reação:

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

Os peroxissomos contêm a maior parte da catalase celular, enzima que converte peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

A atividade da catalase é importante porque o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que se forma nos peroxissomos é um oxidante enérgico e prejudicaria a célula se não fosse eliminado rapidamente.

Os peroxissomos apresentam, ao microscópio eletrônico, uma matriz granular envolta por membrana, e tamanho variável. Muitos peroxissomos exibem um cristaloide, elétron-denso e constituído de catalase. Os peroxissomos são identificados ao microscópio eletrônico por conferirem reação positiva para a enzima catalase.

Essas organelas têm sido bem estudadas nas células do rim e do fígado de mamíferos. Entre outras enzimas, contêm catalase, enzimas da β-oxidação dos ácidos graxos, urato-oxidase e D-aminoácido-oxidase. Participam da metabolização do ácido úrico, resultante das bases púricas. A presença da enzima D-aminoácido-oxidase está provavelmente relacionada com a metabolização dos D-aminoácidos da parede das bactérias que penetram no organismo, pois as proteínas dos mamíferos são constituídas exclusivamente por L-aminoácidos. Os peroxissomos têm também um papel na desintoxicação. Por exemplo, cerca da metade do álcool etílico (etanol) consumido por uma pessoa é destruído por oxidação nos peroxissomos, principalmente nos peroxissomos do fígado e dos rins. Os peroxissomos participam, como as mitocôndrias, da β-oxidação dos ácidos graxos, assim chamada porque os ácidos graxos são rompidos no carbono da posição dois ou beta. Os peroxissomos catalisam a degradação dos ácidos graxos, produzindo acetil-CoA, que pode penetrar nas mitocôndrias, na qual irá participar da síntese de ATP por meio do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs). As moléculas de acetil-CoA podem ser utilizadas em outros compartimentos citoplasmáticos para a síntese de moléculas diversas. Calcula-se que 30% dos ácidos graxos sejam oxidados em acetil-CoA nos peroxissomos.

O conteúdo enzimático dos peroxissomos varia muito de uma célula para a outra, notando-se ainda que, em uma mesma célula, nem todos os peroxissomos têm a mesma composição enzimática. Essas enzimas são produzidas pelos polirribossomos do citosol, conforme as necessidades da célula e, muitas vezes, como uma adaptação para a destruição de moléculas estranhas que penetram na célula, como álcool etílico e diversos fármacos.

Receptores da membrana dos peroxissomos captam proteínas que apresentam sinal específico e são sintetizadas no citosol

Os peroxissomos crescem pela incorporação de proteínas sintetizadas nos polirribossomos livres no citosol, contendo uma sequência especial de três aminoácidos próximos à extremidade carboxila da molécula proteica. Essa sequência é reconhecida por receptores da membrana, e a proteína é transportada para o interior dos peroxissomos. Assim, os peroxissomos crescem e, após atingirem determinado tamanho, dividem-se por fissão (Figura 1.6). O processo foi bem estudado, tomando-se como modelo a catalase. A molécula de catalase é constituída por quatro polipeptídios idênticos, cada um deles ligado a um grupo heme. A catalase é liberada pelos polirribossomos no citosol sob a forma de polipeptídios, sem o grupo heme, denominados apocatalase. As moléculas de apocatalase, que contêm o sinal para os peroxissomos, são reconhecidas pela membrana dos peroxissomos e penetram nessa organela, na qual se unem para formar os tetrâmeros, que, em seguida, recebem quatro grupos heme.

As moléculas receptoras, que ficam presas nas membranas dos peroxissomos, provocando saliência na face citoplasmática, também são sintetizadas nos polirribossomos livres e captadas – porém não introduzidas – no peroxissomo, permanecendo presas na superfície da membrana dessa organela.

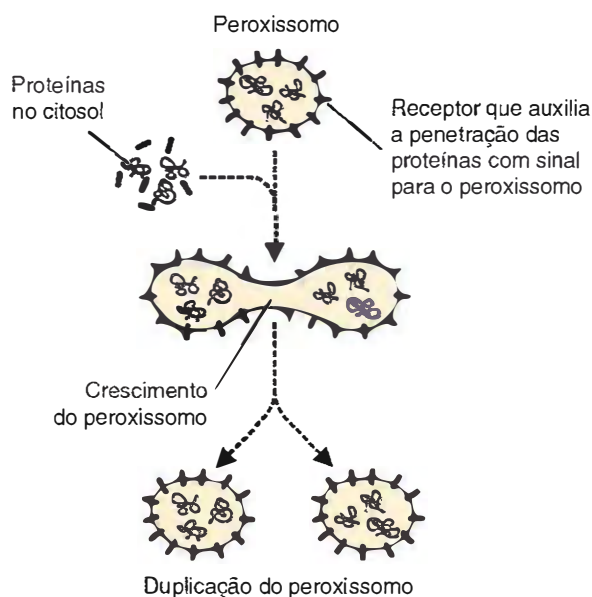



Figura 1.6 ▪ Os peroxissomos se multiplicam por um processo ainda pouco conhecido de divisão binária. A ilustração mostra que as proteínas para essa organela são sintetizadas no citosol. Algumas ficam presas à membrana do peroxissomo; porém, determinadas proteínas têm sinais peptídicos (sequências de aminoácidos) que marcam sua destinação para o interior dos peroxissomos. Essas moléculas proteicas atravessam a membrana e aumentam o tamanho da organela, a qual, enfim, divide-se em duas.

Doenças humanas por defeitos nos peroxissomos

A síndrome cérebro-hepatorrenal, ou síndrome de Zellweger, é um distúrbio hereditário raro, no qual aparecem diversos defeitos neurológicos, hepáticos e renais, que levam à morte muito cedo, geralmente na infância. Foi obser-vado que o fígado e os rins desses pacientes apresentam peroxissomos vazios, constituídos somente pelas membranas, sem as enzimas normalmente localizadas no interior dessas organelas. Essas enzimas aparecem livres no citosol, no qual não podem funcionar normalmente. Portanto, as células desses pacientes não perdem a capacidade de sintetizar as enzimas típicas dos peroxissomos, mas, sim, a possibilidade de transferir para os peroxisso-mos as enzimas produzidas. O estudo genético dos portadores da síndrome de Zellweger detectou mutações em cerca de diversos genes, todos codifi-cadores de proteínas que participam do processo de importação de enzimas pelos peroxissomos. Esses genes já foram isolados, e foi demonstrado que as proteínas que eles codificam são receptores para enzimas dos peroxissomos, ou então, de algum outro modo, participam da maquinaria responsável pela introdução das enzimas nos peroxissomos. O número de genes e proteínas envolvido mostra a complexidade do processo de translocação de enzimas para o interior dessas organelas.

Outras doenças hereditárias dos peroxissomos são decorrentes da falta de apenas uma enzima, ao contrário do que acontece na síndrome de Zellweger. A adrenoleucodistrofia é um exemplo de deficiência em apenas uma enzima dos peroxissomos. Trata-se de uma mutação no cromossomo X que, geralmente, manifesta-se nos meninos antes da puberdade, quando aparecem sintomas de deficiência na secreção da glândula adrenal e disfunções neurológicas. Os defeitos resultam do acúmulo nos tecidos de numerosas moléculas de ácidos graxos saturados de cadeia muito longa, porque os peroxissomos desses doentes não oxidam os ácidos graxos saturados de cadeia muito longa.

Citoesqueleto

Muitas células apresentam forma irregular, existindo algumas, como os neurônios ou células nervosas, com prolongamentos muito longos. Além disso, o núcleo, as organelas, vesículas de secreção e outros componentes celulares têm localização definida, quase sempre constante, conforme o tipo celular. Essas observações levaram os pesquisadores a admitirem a existência de um citoesqueleto que desempenharia apenas um papel mecânico, de suporte, mantendo a forma celular e a posição de seus componentes. Estudos posteriores, além de confirmarem a existência do citoesqueleto, mostraram que seu papel funcional é muito mais amplo. Ele estabelece, modifica e mantém a forma das células. É responsável também pelos movimentos celulares como contração, formação de pseudópodos e deslocamentos intracelulares de organelas, cromossomos, vesículas e grânulos diversos. Os principais elementos do citoesqueleto são os microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. Os microtúbulos e os microfilamentos de actina, com a cooperação das proteínas motoras (Capítulo 7), participam dos movimentos celulares e dos deslocamentos de partículas dentro das células.

Depósitos citoplasmáticos

O citoplasma pode conter, conforme o tipo celular estudado e seu estado funcional, acúmulos, geralmente temporários, de substâncias diversas, não envoltas por membrana.

São frequentes os depósitos do polissacarídio glicogênio, sob a forma de grânulos esféricos com 30 nm de diâmetro, que podem existir isoladamente ou agrupados (Figura 1.7). O glicogênio, um polímero da glicose, é uma reserva energé-tica para as células animais. Muitas células contêm gotículas lipídicas (Figura 1.8) de constituição química e tamanho muito variáveis.

Depósitos de pigmentos também não são raros; um exem-plo é a melanina, encontrada nos cromatóforos e nas células da epiderme (camada mais superficial da pele), e outro exemplo é a lipofuscina, pigmento pardo que se acumula em algumas células de vida longa, como neurônios e células musculares cardíacas, à medida que elas envelhecem.

Os depósitos que contêm pigmento são, em parte, responsáveis pela cor dos seres vivos, com implicações nos processos de mimetismo, na atração para acasalamento e na proteção contra as radiações ultravioleta da luz do sol.

O núcleo contém os cromossomos e é separado do citoplasma por membrana dupla, o envoltório nuclear

Uma das principais características da célula eucarionte é a presença de um núcleo de forma variável, porém bem individualizado e separado do restante da célula por duas membranas. Todavia,

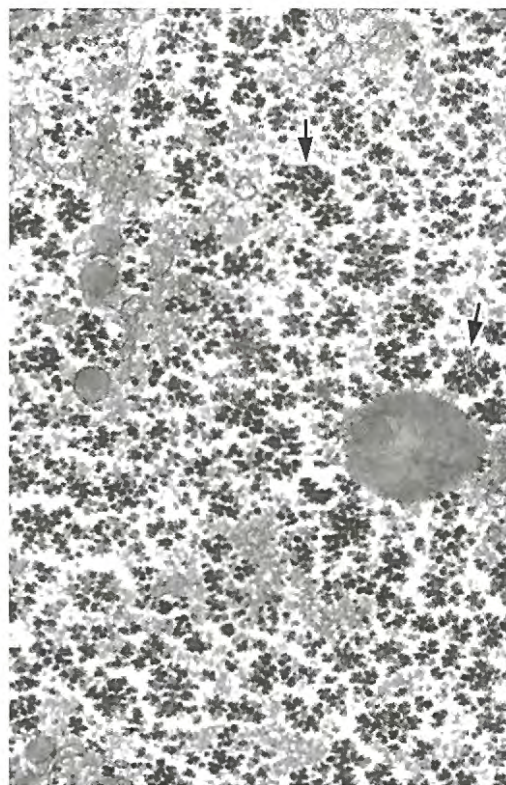



Figura 1.7 ▪ Micrografia eletrônica: grânulos de glicogênio; a maioria deles forma aglomerados (*setas*). Célula do fígado. Aumento: 62.000×.

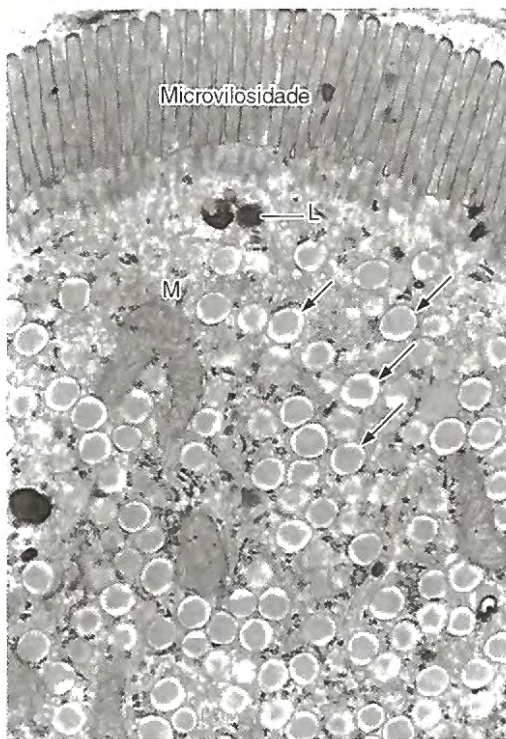



Figura 1.8 ▪ Eletromicrografia: depósitos temporários de lipídios no citoplasma de célula absortiva do intestino delgado. Essas células apresentam muitos prolongamentos em sua superfície livre, os microvilos ou microvilosidades que aumentam a superfície e facilitam a absorção de nutrientes. Notar mitocôndrias (M) e lisossomos (L). Depois de absorvidos pelas células, os lipídios se acumulam temporariamente nas cisternas do retículo endoplasmático liso, estando envolvidos por membranas deste retículo (*setas*). Aumento: 10.000×. (Cortesia de H. I. Friedman.)

essa membrana dupla, chamada envoltório nuclear, contém poros que regulam o intenso trânsito de macromoléculas do núcleo para o citoplasma e deste para o núcleo. Todas as moléculas de RNA do citoplasma são sintetizadas no núcleo, e todas as moléculas proteicas do núcleo são sintetizadas no citoplasma. A membrana externa do envoltório nuclear contém polirribossomos, fazendo parte do retículo endoplasmático rugoso (Figura 1.2).

▪ Cromatina

A observação microscópica dos preparados fixados mostra que o núcleo celular contém grânulos de tamanho variável e forma irregular, que se coram intensamente por corantes básicos. O material que constitui esses grânulos foi chamado de cromatina, em uma época em que nada se conhecia sobre a sua constituição química. Atualmente, sabe-se que a cromatina é constituída por ácido desoxirribonucleico (DNA) associado a proteínas. As células eucariontes, em comparação com as procariontes, contêm uma quantidade muito maior de DNA, que apresenta grande complexidade, estando associado a diversas proteínas como as histonas. As proteínas têm importante papel nas funções e na organização do DNA, tanto no núcleo interfásico, isto é, que não está em mitose, como na condensação dos cromossomos na divisão celular.

▪ Nucléolo

Os nucléolos são corpúsculos em geral esféricos, geralmente visíveis nas células vivas, examinadas ao microscópio sem qualquer coloração.

Os nucléolos contêm grande quantidade de ácido ribonucleico (RNA) e de proteínas básicas, ao lado de pequena quantidade de DNA. Geralmente, os nucléolos são basófilos em razão do RNA, que se cora por corantes básicos; contudo, os que apresentam elevado teor de proteínas básicas, que têm afinidade pelos corantes ácidos, são acidófilos (o significado da basofilia e da acidofilia será explicado no Capítulo 2).

▪ Características que distinguem as células eucariontes vegetais das animais

As células dos vegetais superiores (plantas) são eucariontes e assemelham-se, em sua estrutura básica, às células animais. As principais diferenças serão citadas a seguir, e, para mais detalhes, consulte o Capítulo 13.

▸ **Presença de paredes.** Além da membrana plasmática, as células das plantas contêm uma ou mais paredes rígidas que lhes conferem forma constante e protegem o citoplasma prin-cipalmente contra agressões mecânicas e a ação de parasitos.

▸ **Presença de plastídios.** Uma das principais características das células das plantas é a presença dos plastídios, também chamados plastos, que são organelas maiores do que as mitocôndrias e, como elas, delimitadas por duas unidades de mem-brana. Os plastídios que não contêm pigmentos são chamados leucoplastos. Os que contêm pigmentos são os cromoplastos, dos quais os mais frequentes são os cloroplastos, ricos em clo-rofila, principal pigmento fotossintético.

▸ **Vacúolos citoplasmáticos.** As células das plantas contêm, com frequência, vacúolos citoplasmáticos muito maiores do que os que existem no citoplasma das células animais. Os vacúolos das células vegetais podem ocupar a maior parte do volume celular, reduzindo-se o citoplasma funcional a uma delgada faixa na periferia da célula.

▸ **Presença de amido.** Ao contrário das células eucariontes animais, que utilizam o polissacarídio glicogênio como reserva energética, nas células das plantas o polissacarídio de reserva é o amido.

▸ **Presença de plasmodesmos.** As células vegetais têm tubos com 20 a 40 nm de diâmetro ligando células adjacentes. Essas conexões são chamadas plasmodesmos e estabelecem canais para o trânsito de moléculas. As células animais não apresen-tam plasmodesmos; porém, muitas se comunicam por meio das junções comunicantes (Capítulo 5), que são morfologica-mente muito diferentes, mas apresentam semelhanças funcio-nais com os plasmodesmos.

▪ Origem e evolução das células

Admite-se que o processo evolutivo que originou as primeiras células começou na Terra a aproximadamente 4 bilhões de anos. Naquela época, a atmosfera provavelmente continha vapor d'água, amônia, metano, hidrogênio, sulfeto de hidrogê-nio e gás carbônico. O oxigênio livre só apareceu muito depois, graças à atividade fotossintética das células autotróficas.

Há 4 bilhões de anos, a superfície da Terra estaria coberta por grande quantidade de água, disposta em grandes "oceanos" e "lagoas". Essa massa líquida, chamada de caldo pri-

mordial, era rica em moléculas inorgânicas e continha em solução os gases que constituíam a atmosfera daquela época. Sob a ação do calor e da radiação ultravioleta, vindos do sol, e de descargas elétricas, oriundas das tempestades que eram muito frequentes, as moléculas dissolvidas no caldo primordial combinaram-se quimicamente para constituírem os primeiros compostos contendo carbono. Substâncias relativamente complexas como proteínas e ácidos nucleicos, que, nas condições terrestres atuais, só se formam pela ação das células ou por síntese nos laboratórios químicos, teriam aparecido espontaneamente, ao acaso. Esse tipo de síntese, realizada sem a participação de seres vivos, é denominada prebiótica, e já foi demonstrado experimentalmente que ela é possível figura 1.9). O acúmulo gradual dos compostos de carbono foi favorecido por três circunstâncias: (1) a enorme extensão da Terra, com grande variedade de nichos, onde provavelmente ocorreu a formação de moléculas que foram mantidas próximas umas das outras e, certamente, diferentes das existentes em outros locais; (2) o longo tempo, cerca de 2 bilhões de anos, período em que ocorreu a síntese probiótica no caldo primordial; e (3) a ausência de oxigênio na atmosfera, já mencionada, e importante porque assim as moléculas neoformadas

Figura 1.9 ▪ Aparelho criado por Stanley L. Miller para demonstrar a síntese de moléculas orgânicas, sem a participação de seres vivos (síntese prebiótica), nas condições da atmosfera terrestre há cerca de 4 bilhões de anos. O aparelho continha vapor d'água, proveniente do aquecimento do balão inferior. Pela torneira superior esquerda introduziam-se, na coluna, metano, amônia, hidrogênio e gás carbônico. Ao passar pelo balão superior direito, a mistura era submetida a centelhas elétricas. A mistura tornava-se líquida no condensador e era recolhida pela torneira inferior. Observou-se que esse líquido continha diversas moléculas de compostos de carbono orgânicas), inclusive aminoácidos.

não foram logo destruídas por oxidação. Na atmosfera atual da Terra, a síntese do tipo probiótico é impossível.

É provável que no caldo primordial tenham surgido polímeros de aminoácidos e de nucleotídios, formando-se assim as primeiras moléculas de proteínas e de ácidos nucleicos. Todavia, somente ácidos nucleicos são capazes de autoduplicação, e a demonstração experimental recente de que, em laboratório, moléculas de RNA simples são capazes de evoluir para moléculas mais complexas, sem auxílio de proteínas enzimáticas, faz supor que a evolução começou com moléculas de RNA. Como será visto adiante, no Capítulo 3, o RNA pode ter atividade enzimática, propriedade que já se pensou ser exclusiva das proteínas. Aparecidas as primeiras moléculas de RNA com capacidade de se multiplicarem e de evoluir, estava iniciado o caminho para as primeiras células. Porém, era necessário que o sistema autocatalítico ficasse isolado, para que as moléculas não se dispersassem no líquido prebiótico. Provavelmente ao acaso, formaram-se moléculas de fosfolipídios que, espontaneamente, constituíram as primeiras bicamadas fosfolipídicas, e estas podem ter englobado conjuntos de moléculas de ácidos ribonucleicos, nucleotídios, proteínas e outras moléculas. Estava, assim, constituída a primeira célula, com sua membrana fosfolipídica. Os fosfolipídios são moléculas alongadas, com uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas. Quando estão dissolvidas em água, as moléculas de fosfolipídios se prendem por interação hidrofóbica de suas cadeias e constituem bicamadas espontaneamente, sem necessidade de energia (Capítulo 5).

Os dados hoje disponíveis permitem supor que, em seguida ao ácido ribonucleico (RNA), deve ter surgido o ácido desoxirribonucleico (DNA), formado pela polimerização de nucleotídios sobre um molde (*template*) de RNA, e os dois tipos de ácidos nucleicos passaram a determinar os tipos de proteínas a serem sintetizadas. Considerando a enorme variedade de proteínas celulares, formadas por 20 monômeros diferentes (os 20 aminoácidos), é pouco provável que todas as proteínas se tenham formado por acaso. A síntese das proteínas deve ter sido dirigida pelos ácidos nucleicos, com eliminação das proteínas inúteis, pelo próprio processo evolutivo.

É razoável supor que a primeira célula que surgiu era estruturalmente simples, certamente uma procarionte heterotrófica, e, também, que essa célula foi precedida por agregados de RNA, DNA e proteínas, envoltos por bicamada de fosfolipídios. Esses agregados continuaram o processo evolutivo iniciado pelas moléculas de RNA, e deram origem às primeiras células, que devem ter sido procariontes estruturalmente simples.

Como essas primeiras células procariontes eram heterotróficas e, portanto, incapazes de sintetizar compostos ricos em energia (alimentos), o processo evolutivo teria sido interrompido pelo esgotamento dos compostos de carbono formados pelo processo probiótico, nos nichos em que surgiram as células primordiais. Essas primeiras células, além de procariontes e heterotróficas, eram também anaeróbias, pois não existia oxigênio na atmosfera. Teria sido difícil sustentar o processo evolutivo das células primitivas, se elas tivessem permanecido dependentes, para sua nutrição, das moléculas energéticas formadas por síntese probiótica no caldo primordial.

A manutenção da vida na Terra dependeu, então, do apare-cimento das primeiras células autotróficas, ou seja, capazes de sintetizar moléculas complexas a partir de substâncias muito simples e da energia solar. Admite-se que tenha surgido, em células procariontes, um sistema capaz de utilizar a energia do sol e armazená-la em ligações químicas, sintetizando assim alimentos e liberando oxigênio. Esse novo tipo celular seria provavelmente muito semelhante às “algas azuis” ou cianofí-ceas, que são bactérias ainda hoje existentes. Iniciou-se, assim, a fotossíntese, que ocorreu em virtude do aparecimento, nas células, de determinados pigmentos, como a clorofila (pig-mento de cor verde), que capta as radiações azul e vermelha da luz do sol, utilizando sua energia para ativar processos sin-téticos.

O oxigênio liberado pela fotossíntese realizada pelas bacté-rias autotróficas foi-se acumulando na atmosfera. Isso produ-ziu grandes alterações na atmosfera, pois as moléculas do gás oxigênio (O_2) se difundiram para as alturas mais elevadas da atmosfera, onde se romperam sob ação da radiação ultravioleta, originando átomos de oxigênio, muitos dos quais se recombi-
naram para formar ozônio (O_3), que tem grande capacidade de absorver o ultravioleta. Desse modo, formou-se, pouco a pouco, uma camada de ozônio que protege a superfície da Terra contra a radiação ultravioleta, mas que é transparente aos comprimen-tos de onda visíveis.

O início da fotossíntese e as modificações da atmosfera foram de grande importância para a evolução das células e das formas de vida hoje existentes na Terra. Graças à fotossíntese, surgiu o oxigênio na atmosfera, e isso permitiu o aparecimento de células aeróbias, ao mesmo tempo em que criou uma cobertura protetora de ozônio nas camadas superiores da atmosfera. As bactérias anaeróbias ficaram restritas a nichos especiais, onde não existe oxigênio.

Supõe-se que o passo seguinte no processo evolutivo, depois das células procariontes autotróficas, foi o surgimento das célu-las eucariontes. Tudo indica que as células eucariontes, carac-terizadas por seu elaborado sistema de membranas, tenham se originado a partir de procariontes, por invaginações da mem-brana plasmática, que foi puxada por proteínas contráteis pre-viamente aparecidas no citoplasma (veja adiante, neste capítulo). Essa hipótese é apoiada pela observação de que as membranas intracelulares mantêm, aproximadamente, a mesma assimetria que existe na membrana plasmática. A face das membranas internas que está em contato com o citosol (matriz citoplas-mática) assemelha-se à sua equivalente na membrana plasmá-tica, e o mesmo acontece com a face voltada para o interior dos compartimentos intracelulares, que tem semelhança com a face externa da membrana plasmática (Figura 1.10). A interiorização da membrana foi fundamental para a evolução das células eucariontes, pois formou diversos compartimentos intracelulares, como o retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos e aparelho de Golgi, que são microrregiões, cada uma com sua composição enzimática típica e atividades funcionais especí-ficas. Esta separação molecular e funcional aumenta muito a eficiência dos processos celulares.

Há evidências sugestivas de que as organelas envolvidas nas transformações energéticas, cloroplastos e mitocôndrias, originaram-se de bactérias que foram fagocitadas, escaparam dos mecanismos de digestão intracelular e se estabeleceram como simbiontes (endossimbiontes) nas células eucariontes hospedeiras, criando um relacionamento mutuamente benéfico e que se tornou irreversível com o passar dos anos (Figura 1.1 1),

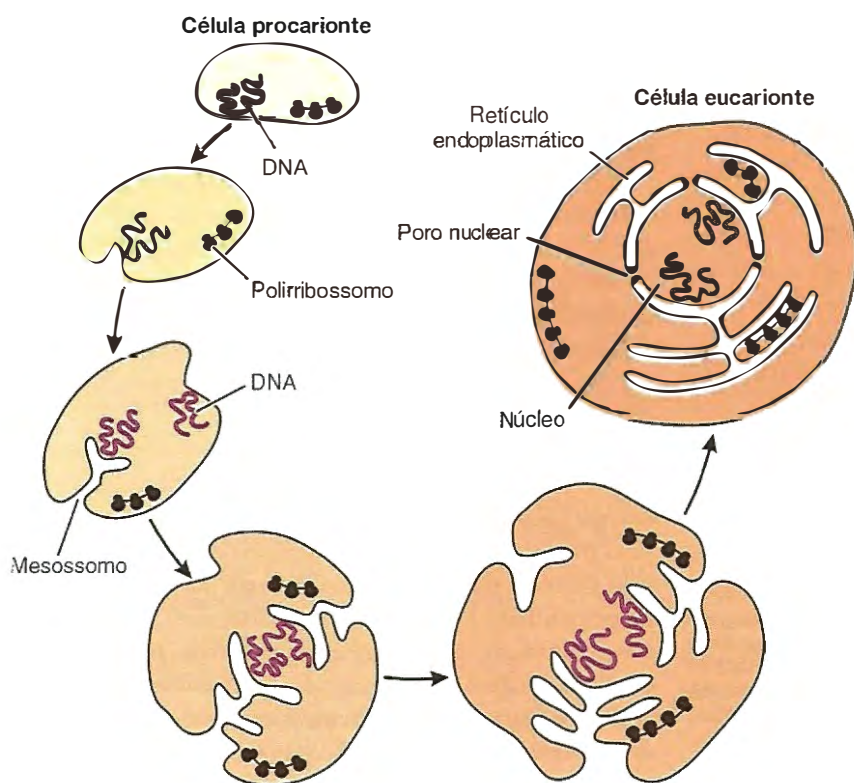



Figura 1.10 ▪ A ilustração mostra como, provavelmente, apareceram os compartimentos intracelulares, por invaginações da membrana plasmática. Essa hipótese é apoiada pela observação de que as membranas intracelulares têm constituição molecular muito semelhante à da membrana plasmática.

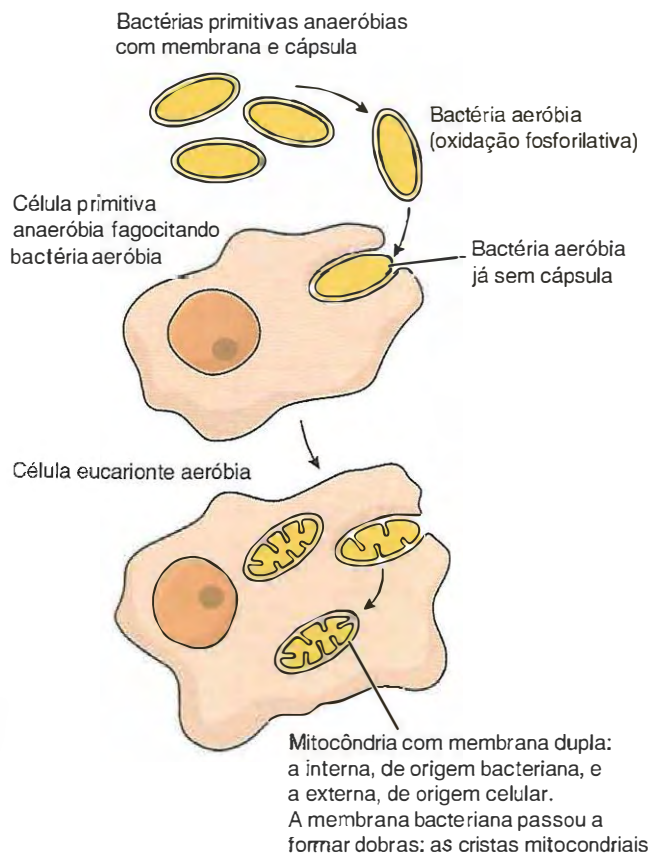



Figura 1.11 ▪ Desenho esquemático que mostra a teoria da origem bacteriana das mitocôndrias, por endossimbiose. Células eucariontes anaeróbias, primitivas, teriam fagocitado bactérias aeróbias, as quais, de algum modo, escaparam à digestão intracelular e estabeleceram inter-relações mutuamente úteis com as células hospedeiras, que assim se tornaram aeróbias. Ao mesmo tempo, as bactérias, entre outras vantagens, receberam proteção e alimentação em sua nova localização no citoplasma da célula hospedeira.

em razão de mutações ocorridas no endossimbionte (chama-se endossimbionte um simbionte intracelular). As principais evidências a favor dessa hipótese são:

- mitocôndrias e cloroplastos contêm um genoma de DNA circular, como o das bactérias
- essas organelas têm duas membranas, sendo a interna semelhante, em sua composição, às membranas bacterianas, enquanto a externa, que seria a parede do vacúolo fagocitário, assemelha-se à membrana das células eucariontes hospedeiras.

Além disso, simbiose entre bactérias e células eucariontes continua acontecendo, sendo inúmeros os casos atualmente existentes.

Ao longo da evolução, tanto as mitocôndrias como os cloroplastos foram perdendo seu genoma para o núcleo da célula hospedeira, tornando-se dependentes do DNA dos cromossomos das células hospedeiras. A maior parte das proteínas das mitocôndrias e dos cloroplastos é codificada por RNA mensageiro proveniente do núcleo celular, sintetizadas nos polirribossomos da matriz citoplasmática e, depois, transferidas para dentro das mitocôndrias e cloroplastos.

Como surgiram as células eucariontes?

O surgimento das células eucariontes, durante o lento processo evolutivo, é um aspecto de difícil elucidação, principalmente porque não existem hoje células intermediárias entre procariontes e eucariontes, o que facilitaria o esclarecimento dessa modificação evolutiva.

Parece claro que, embora as mitocôndrias e os cloroplastos sejam derivados de células procariontes, é difícil imaginar a formação de uma célula eucarionte pela simples união entre duas células procariontes típicas. Uma delas deve ter sofrido modificações evolutivas que não foram conservadas nas células procariontes atuais. É possível que as células eucariontes tenham evoluído gradualmente, na sequência exposta a seguir (Figura 1.12).

Uma célula procarionte heterotrófica e anaeróbia, já com o sistema DNA→RNA→Proteína funcionando, teria perdido a parede celular e, aos poucos, aumentado de tamanho e formado invaginações na membrana plasmática. Admite-se que, nessas reentrâncias, acumularam-se enzimas digestivas que permitiram uma melhor digestão das partículas de alimentos. Então, algumas invaginações se desprenderam da membrana, formando vesículas membranosas que deram origem ao sistema lisossômico, às vesículas precursoras do retículo endoplasmático, e levaram para a parte profunda da célula o DNA que estava preso à membrana plasmática. Com o aparecimento de oxigênio na atmosfera, devido às bactérias fotossintéticas, devem ter surgido os peroxissomos, defendendo as células contra a ação deletéria de radicais livres contendo oxigênio. Houve um aumento de DNA, paralelo à crescente complexidade celular, e esse DNA, constituído de longas fitas, foi concentrado em cromossomos, que foram segregados dentro do núcleo delimitado pelo envoltório nuclear que se formou a partir do material membranoso vindo da superfície celular. Houve também um desenvolvimento do citoesqueleto, com o aparecimento de microtúbulos e aumento na quantidade de microfilamentos. À medida que a concentração de oxigênio foi lentamente aumentando na atmosfera, as células que incorporaram procariontes aeróbios predominaram por seleção natural, por duas razões: a respiração aeróbia é muito mais eficiente e, além disso, gasta oxigênio, diminuindo a formação intracelular de radicais livres (radicais de oxigênio). Estes radicais oxidantes danificam muitas macromoléculas, podendo prejudicar o funcionamento das células. A endossimbiose (simbiose intracelular) de procariontes aeróbios deu origem às mitocôndrias, organelas com duas membranas, sendo a interna da bactéria precursora e a externa da célula eucarionte que estava em formação. Provavelmente, os cloroplastos se originaram de maneira semelhante, também por endossimbiose, porém de bactérias fotossintéticas. Ao longo da evolução, houve transferência da parte do genoma dos cloroplastos e mitocôndrias, para os núcleos celulares; mas os cloroplastos transferiram menos DNA, em comparação com as mitocôndrias. É possível que a endossimbiose das mitocôndrias tenha ocorrido antes da endossimbiose que originou os cloroplastos.

Padrões celulares e os grandes grupos de seres vivos

O sistema mais antigo de classificação, criado por Lineu, dividia os seres vivos em apenas dois reinos – o animal e o vegetal. No primeiro estavam incluídos os heterótrofos, que se alimentam por ingestão, exceto os parasitos, que se nutrem por osmose. No reino vegetal estavam incluídos os organis-

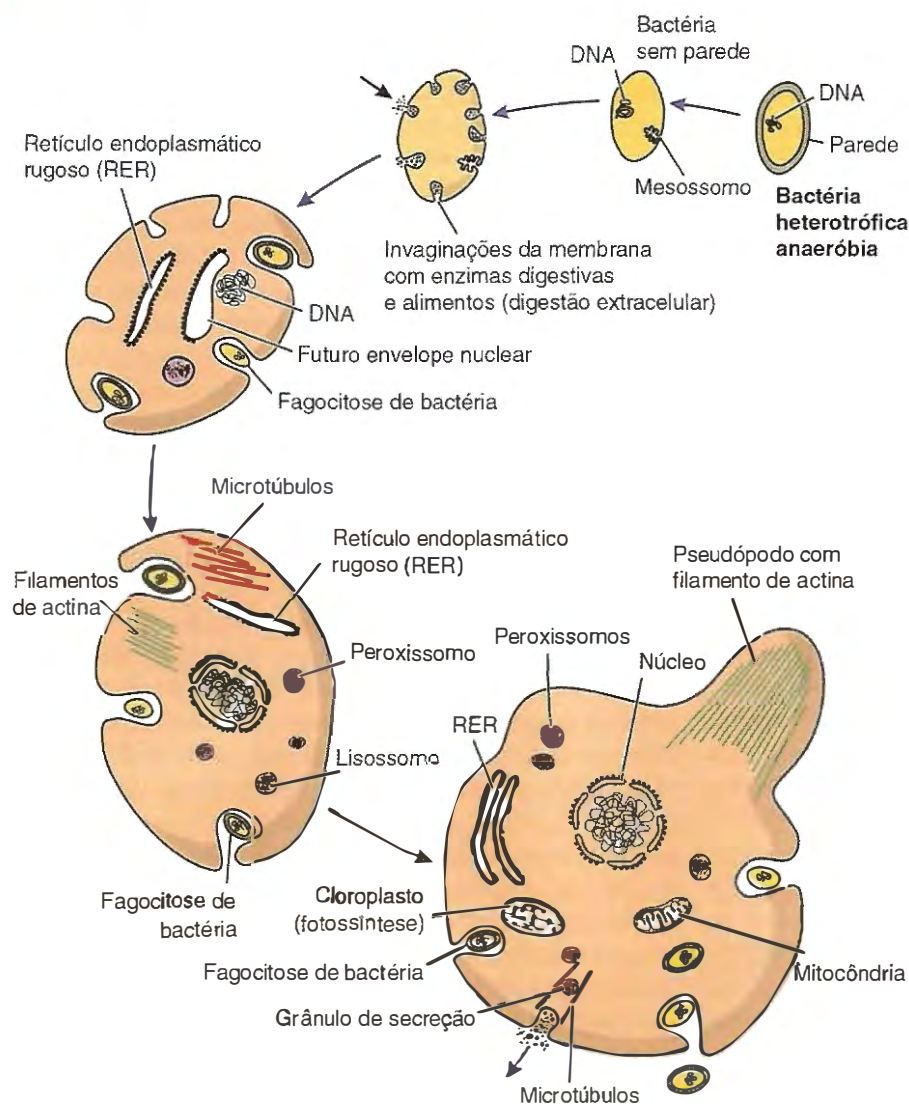



Figura 1.12 ▪ Desenho fundamentado principalmente nos trabalhos de C. de Duve, que mostra a maneira como, provavelmente, se constituíram as primeiras células eucariontes, no longo processo evolutivo que precedeu o aparecimento dos seres pluricelulares. Para explicações, veja texto do item *Como surgiram as células eucariontes?*.

mos fotossintetizantes, englobando as plantas, as bactérias, os mixomicetos e os fungos.

Em razão dos inconvenientes óbvios da divisão dos seres vivos em dois reinos, foram criadas outras divisões, mais elaboradas e mais condizentes com os novos conhecimentos. Um sistema ainda usado, porém, como o de Lineu, fundamentado principalmente na estrutura dos seres vivos e no modo de captação de nutrientes, admite cinco reinos (Figura 1.13):

- **Monera:** formado pelas bactérias, que são os únicos seres procariontes (as cianofíceas, ou "algas azuis", também são bactérias)
- **Protista:** que compreende organismos eucariontes primariamente unicelulares de vida livre ou unicelulares coloniais (protozoários e fitoflagelados)
- **Fungi:** que compreende todos os fungos
- **Plantae:** que inclui as algas clorofíceas e os vegetais superiores
- **Animalia:** que inclui todos os animais, isto é, os seres que, durante o desenvolvimento embrionário, passam pelo estágio de gástrula.

O conceito atual de protista não é o mesmo proposto por Haeckel no passado. Atualmente, incluem-se entre os protistas os protozoários e os organismos limítrofes, como os fitoflagelados, que sempre foram objeto de disputa, pois eram incluídos por uns entre os animais e, por outros, entre os vegetais, na antiga classificação em dois reinos.

Na classificação de Lineu, os fungos eram considerados vegetais (porque não têm mobilidade) sem clorofila, porém foram depois colocados em grupo separado, porque apresentam algumas características próprias, não compartilhadas nem pelos animais nem pelos vegetais:

- não apresentam clorofila nem quaisquer outros pigmentos fotossintetizantes
- não formam tecidos verdadeiros
- não têm parede de celulose (característica dos vegetais), mas, sim, fundamentalmente composta de quitina (característica dos animais)
- não armazenam amido (reserva nutritiva dos vegetais) como reserva energética, mas, sim, glicogênio (reserva nutritiva dos animais).

Mais recentemente, os avanços tecnológicos da biologia molecular possibilitaram o estudo mais aprimorado das relações evolutivas entre os organismos, ou filogênese. De fato,

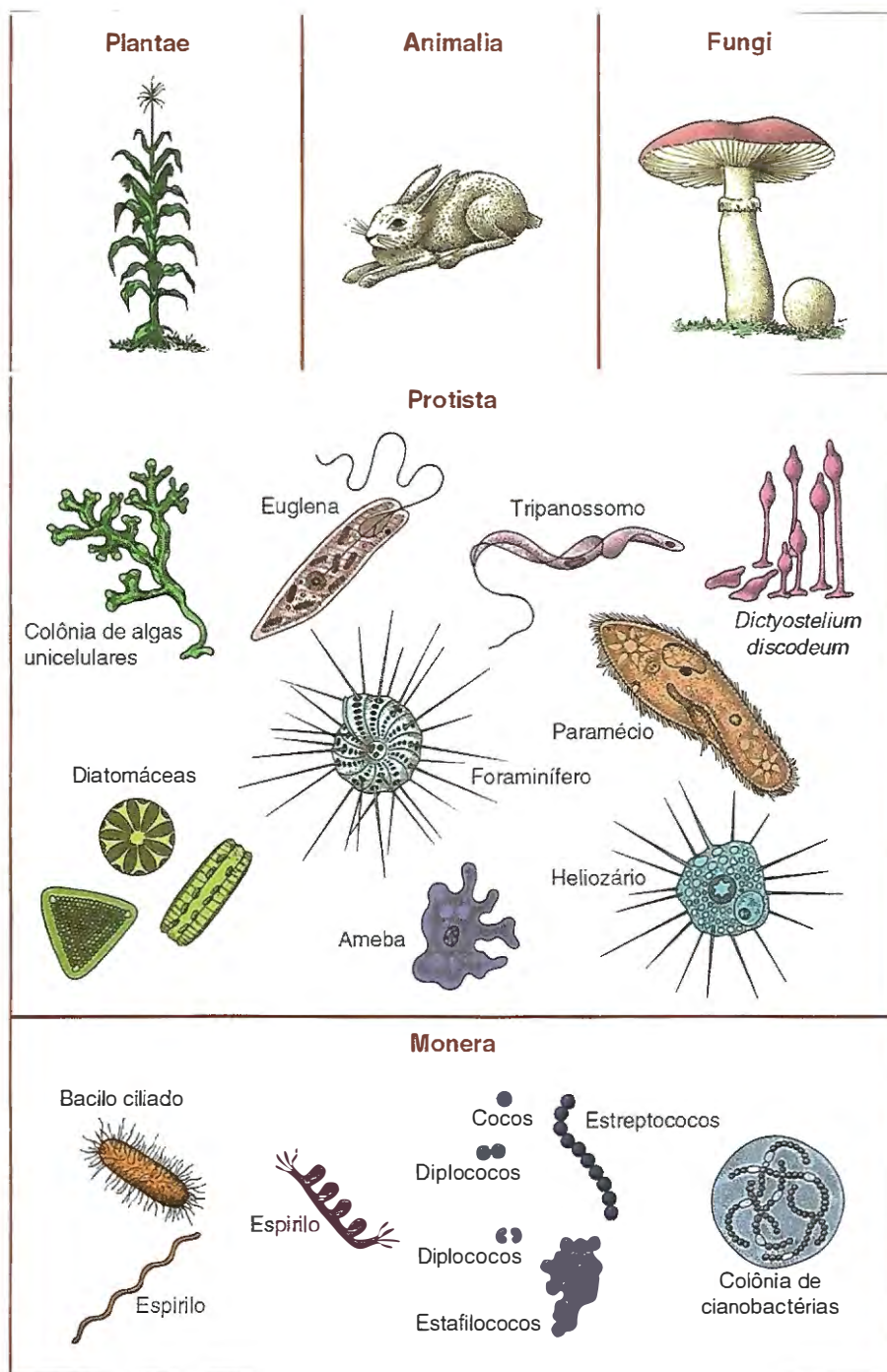



Figura 1.13 ▪ Esquema dos cinco "reinos" a que pertencem os seres vivos. O "reino" monera, único cujas células são procariontes, é constituído pelas bactérias (incluindo as cianofíceas ou "algas azuis"). Nos demais "reinos", todas as células são eucariontes. O "reino" protista é composto de formas unicelulares ou unicelulares coloniais. O "reino" fungi compreende os fungos. O "reino" plantae inclui os vegetais superiores. No "reino" animalia estão todos os animais.

a elucidação da evolução molecular das células parece ser a melhor maneira de esclarecer as origens das células atualmente existentes e de desvendar as características das células primordiais, que apareceram há cerca de 3,5 bilhões de anos e que são as precursoras das células atuais. Esses estudos podem ser feitos por meio de diversos tipos de moléculas, como a sequência de aminoácidos nas proteínas e de nucleotídios nos ácidos nucleicos, ou a presença ou ausência de enzimas importantes para o metabolismo dos organismos.

Todavia, os pesquisadores observaram que a análise da sequência de nucleotídios no RNA dos ribossomos, ou rRNA, é uma boa maneira de estudar a filogênese. Todas as células têm ribossomos e seu RNA é muito constante em suas funções, servindo como um "relógio molecular" adequado para estimar as modificações evolutivas que ocorreram durante os bilhões de anos, desde que surgiram as primeiras células na Terra. Até mesmo modificações muito pequenas na estrutura de um RNA ribossômico fazem com que ele deixe de ser funcional. Assim, sua sequência de nucleotídios foi bem conservada, ou seja, mantida constante, nas diversas linhas filogenéticas, e a distância evolutiva entre os organismos pode ser detectada pelas pequenas diferenças na sequência de nucleo-

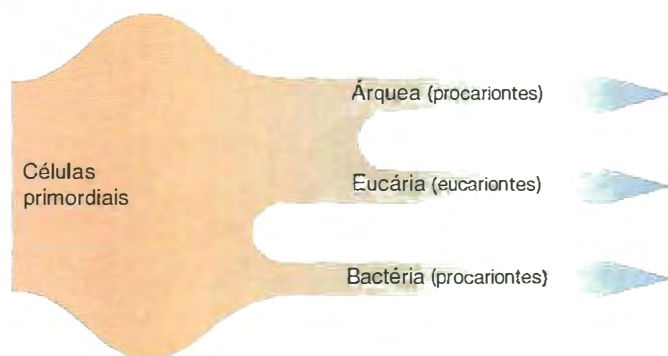



Figura 1.14 ▪ Esquema que mostra a divisão dos seres vivos em três grupos ou domínios, com base na sequência de nucleotídios no RNA ribossômico. Notar que o grupo eucária se separou do grupo árquea posteriormente, sendo o grupo bactéria o mais antigo. Eucária e árquea são mais aproximados, em termos moleculares, e o grupo bactéria é o mais afastado.

tídios no rRNA. Os ribossomos contêm três tipos de RNA, designados 5S, 16S e 23S, nas células procariontes. Nas células eucariontes, o rRNA 16S é substituído por um rRNA 18S. A letra S, de Sved-berg, indica o tamanho da molécula, que se relaciona com seu coeficiente de sedimentação em uma ultracentrífuga (Capítulo 3).

Em razão do seu tamanho conveniente, o rRNA 16S (18S nas células eucariontes) é o mais utilizado nos estudos filogenéticos. O rRNA 5S tem apenas 125 nucleotídios, o que limita muito as informações que ele pode fornecer, enquanto o rRNA 23S, com 2.900 nucleotídios, é muito grande, e o estudo de sua molécula é mais difícil e laborioso.

Pelo estudo da sequência de nucleotídios no rRNA 16S das células procariontes e 18S das eucariontes, foram construídas novas árvores evolutivas, que dividem os organismos em grupos diferentes dos que aparecem nas classificações anteriores (Figura 1.14). Essa comparação entre os organismos está baseada no conceito de que organismos que se diversificaram mais cedo tiveram mais tempo para acumular modificações no seu RNA ribossômico do que os organismos que se separaram mais recentemente. Os pesquisadores que realizaram esses estudos concluíram que a célula procarionte ancestral universal se ramificou inicialmente em duas direções, dando origem aos grupos ou domínios árquea e bactéria (Figura 1.14). Posteriormente e a partir do domínio árquea, surgiram as primeiras células eucariontes que constituíram o domínio eucária. O domínio árquea compreende os procariontes metanógenos (que produzem o gás metano como produto de seu metabolismo) e os que vivem em condições extremas de alta ou baixa temperatura e salinidade, acidez ou alcalinidade elevadas. Por suas características moleculares, como a composição do rRNA, essas células procariontes mostram algumas semelhanças com os seres do domínio eucária e muitas diferenças com o domínio bactéria. Além de diferenças no rRNA, as células do domínio árquea têm paredes celulares sem proteoglicanas, compostos encontrados nas paredes das bactérias. O domínio eucária engloba todos os seres constituídos por células eucariontes, e o domínio bactéria engloba as bactérias atualmente mais conhecidas e denominadas também de eubactérias.

Resumo

Os vírus são estruturas não celulares, mas só se multiplicam no interior das células, cuja maquinaria utilizam para a produção de novos vírus. Por serem parasitos intracelulares frequentes, serão estudados neste livro. Os vírus são formados de uma parte central com a informação genética codificada seja em DNA ou em RNA. Esse genoma é protegido por uma estrutura que o envolve, constituída por unidades proteicas denominadas capsômeros. Alguns vírus apresentam um invólucro lipoproteico, que contém lipídios da célula parasitada e glicoproteínas virais.

Apesar da grande diversidade entre os seres vivos, todos constituídos por células, existem apenas dois tipos celulares básicos: as células procariontes e as eucariontes.

As células procariontes são menores e caracterizam-se pela falta de um sistema de membranas que divida a célula em compartimentos funcionais. Seu cromossomo consiste em filamentos duplos de DNA, de forma circular, localizados em um espaço citoplasmático onde a matriz é menos elétron-densa: o nucleoide. Geralmente, cada bactéria tem mais de uma cópia desse cromossomo simples e que além do DNA contém apenas umas poucas proteínas. Nessas células existe apenas a membrana plasmática, que pode apresentar dobras dirigidas para dentro das células: os mesossomos. Nas células procariontes fotossintéticas, como as bactérias cianofíceas, existem algumas membranas citoplasmáticas que, associadas à clorofila, são responsáveis pela fotossíntese nessas células. As células procariontes não têm citoesqueleto e são de forma simples. A forma dessas células geralmente é mantida pela presença de uma parede extracelular rígida que serve também de proteção mecânica, função importante, pois as bactérias estão presentes em nichos ecológicos muito variáveis e, algumas vezes, pouco favoráveis.

As células eucariontes apresentam-se divididas em compartimentos funcionais graças à presença de um sistema complexo de membranas que cria microrregiões intracelulares especializadas, nas quais determinadas funções podem ser executadas com mais eficiência. Além desse papel de compartimentalização, o sistema de membranas cria uma enorme superfície à qual se prendem, em sequência predeterminada, moléculas enzimáticas e transportadoras. Assim, os substratos são processados pelos diversos componentes das cadeias enzimáticas sem que haja necessidade de grandes deslocamentos, que diminuiriam acentuadamente a rapidez e o rendimento dos processos metabólicos.

Dentre os principais compartimentos das células eucariontes estão o núcleo, o envoltório nuclear, o retículo endoplasmático (liso e rugoso), os endossomos, o aparelho de Golgi, os lisossomos, as mitocôndrias e, nas células vegetais, os plastos ou plastídios, como os cloroplastos. Outra característica das células eucariontes é ter citoesqueleto fibrilar, responsável pelos movimentos celulares e pela manutenção da forma

muitas vezes, altamente complexa – dessas células. O citoesqueleto é constituído de microtúbulos (cerca de 24 nm de diâmetro), filamentos intermediários (cerca de 10 nm de diâmetro) e microfilamentos de actina (cerca de 6 nm de diâmetro). Os microtúbulos e os microfilamentos de actina, junto com as proteínas motoras, participam dos movimentos da célula e dos deslocamentos intracelulares de organelas e vesículas contendo moléculas diversas.

Bibliografia

Alberts, B. *et al.*: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garland Press, 1994.

Barghoorn, E.S.: The oldest fossils. *Sci. Am.*, **224**(5):30, 1971.

Brinkley, B.R.: Microtubule organizing centers. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1:145, 1985.

Cech, T.R.: RNA as an enzyme. *Sci. Am.*, **255**(5):64, 1986.

De Duve, C.: *A Guided Tour of the Living Cell*, 2 vols. Freeman, 1985.

De Duve, C.: *Blueprint for a Cell; The Nature and Origin of Life.* Neil Patterson Pub., 1991.

De Duve, C.: The birth of complex cells. *Sci. Am.*, 274(4):38, 1996.

Fahimi, H.D. and Sies, H. (eds.): *Peroxisomes in Biology and Medicine.* Springer-Verlag, 1987.

Field, K.G. *et al.*: Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science*, **239**:748, 1988.

Fuchs, E. and Hanukoglu, I.: Unraveling the structure of the intermediate filaments. *Cell*, **34**:332, 1983.

Goodman, S.R.: *Medical Cell Biology.* Lippincott, 1994.

Gould, S.J., Keller, G.A. and Subramani, S.: Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *J. Cell Biol.*, **107**:897, 1988.

Gray, M.W.: The evolutionary origins of organelles. *Trends Genetics*, **5**:294, 1989.

Karp, G. *Cell and Molecular Biology; Concepts and Experiments*, 3rd ed. John Wiley, 1999.

Lazarow, P.B. and Fujiki, Y.: Biogenesis of peroxisomes. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**:489, 1985.

Lazarow, P.B.: Genetic approaches to studying peroxisome biogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, 3:89, 1993.

Li, W. H.: *Molecular Evolution.* Sinauer, 1997.

Lodish, H.F. *et al.*: *Molecular Cell Biology*, 3rd. ed. Freeman, 1995.

Madigan, M.T. and Marrs, B.L.: Extremophiles. *Scient. Am.*, **276**(4):66, 1997.

Margulis, L.: *Symbiosis in Cell Evolution.* Freeman, 1981.

Subramani, S.: Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **9**:445, 1993.

Vale, R.D.: Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 3:347, 1987.

Vidal, G.: The oldest eukaryotic cells. *Sci. Am.*, **250(2)**:48, 1984.

Weber, K. and Osborn, M.: The molecules of the cell matrix. *Sci. Am.*, 253(10):110, 1985.

Woese, C.R.: Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, **51**:221, 1987.

Woese, C.R.: There must be a prokaryote somewhere: Microbyology's search for itself. *Microbiological Reviews*, **58**:1, 1994.

Wolfe, S.L.: *Molecular and Cellular Biology.* Wadsworth, 1993.

2 Tecnologia da Biologia Celular e Molecular: Alguns Exemplos

Roteiro

- A biologia celular e molecular estuda objetos muito pequenos, por isso depende inteiramente do aperfeiçoamento dos instrumentos e das técnicas de pesquisa
- Para estudo no microscópio óptico, os tecidos são fixados, cortados e corados; as imagens obtidas podem ser armazenadas em discos de computador e, posteriormente, processadas
- Os microscópios de contraste de fase facilitam o exame de células vivas
- Com o microscópio confocal, é possível fazer cortes ópticos da célula e a reconstituição tridimensional, por computação, das imagens digitalizadas de organelas e outros constituintes celulares
- O microscópio eletrônico de transmissão tem um poder de resolução mais de 100 vezes superior ao do microscópio óptico e revelou numerosas minúcias da estrutura celular que não eram sequer percebidas anteriormente, revolucionando os estudos sobre as células
- O microscópio eletrônico de varredura visa ao estudo das superfícies externas e internas das células e organelas
- A imunocitoquímica é empregada para a localização de macromoléculas celulares específicas
- Nas culturas, as células podem ser mantidas vivas e proliferando por muito tempo, o que facilita o estudo de suas funções
- As organelas podem ser isoladas das células por centrifugação fracionada (centrifugação diferencial)
- A cromatografia em coluna é uma técnica utilizada para separar macromoléculas celulares
- A técnica de eletroforese pode ser utilizada para identificar macromoléculas e para determinar o tamanho das moléculas proteicas.

Os conhecimentos sobre as células progridem paralelamente ao aperfeiçoamento dos métodos de investigação. Inicialmente, o microscópio óptico, também chamado microscópio de luz, possibilitou o descobrimento das células e a elaboração da teoria de que todos os seres vivos são constituídos por células.

Posteriormente, foram descobertas técnicas citoquímicas para a identificação e localização de diversas moléculas constituintes das células. Com o advento dos microscópios eletrônicos, que têm grande poder de resolução, foram observados pormenores da estrutura celular que não poderiam sequer ser imaginados pelos estudos realizados com os microscópios ópticos.

Quase simultaneamente com o uso dos microscópios eletrônicos, foram aperfeiçoados métodos para a separação de organelas celulares e para o estudo *in vitro* de suas moléculas e respectivas funções. A análise de organelas isoladas em grande quantidade, a cultura de células, a possibilidade de manipular o genoma por meio da adição ou supressão de genes e o aparecimento de numerosas técnicas de uso comum aos diversos ramos da pesquisa biológica levaram ao surgimento do que se costuma chamar de biologia celular e molecular, que é o estudo integrado das células, por meio de todo o arsenal técnico disponível. É impossível descrever, mesmo de modo resumido, todas as técnicas utilizadas nos variados estudos sobre as células. Cada pesquisador tem utilizado sua imaginação para criar abordagens das mais variadas, de acordo com o problema a ser resolvido. Neste capítulo, apenas como exemplos, serão estudadas algumas técnicas que têm contribuído de modo significativo para o progresso da biologia celular e molecular. Para manter a dimensão do livro razoável, muitas técnicas não foram relatadas; porém, algumas estão descritas nos capítulos que tratam dos assuntos esclarecidos por elas. Isso as torna mais facilmente compreensíveis; um exemplo é a importante técnica denominada PCR (*Polimerase Chain Reaction*), que está minuciosamente descrita no Capítulo 8.

▪ Confecção de cortes para estudo nos microscópios óptico e eletrônico

Embora seja possível o estudo microscópico de células vivas, muitas vezes há vantagem em obter um preparado permanente (lâmina) no qual as células ficam preservadas, isto é, fixadas e coradas, para melhor demonstração dos seus componentes.

Um preparado permanente ideal deveria mostrar as células com a mesma estrutura microscópica e composição química que tinham quando vivas. Isso, entretanto, não é possível, e todos os preparados apresentam artefatos, que são alterações produzidas nas células pelas técnicas utilizadas.

▸ **Fixação.** A fixação é a primeira etapa para a obtenção de um preparado permanente, e apresenta as seguintes finalidades:

- evitar a autólise, que é a destruição da célula por suas próprias enzimas
- impedir a atividade e a proliferação de bactérias
- endurecer as células para que elas resistam melhor às etapas seguintes da técnica
- aumentar a afinidade das estruturas celulares pelos corantes utilizados na microscopia óptica e aumentar o contraste na microscopia eletrônica (veja adiante, neste capítulo).

A química da fixação é complexa e pouco conhecida. O formol e o aldeído glutárico (glutaraldeído) fixam as células por se combinarem com os grupamentos amínicos das proteínas. O aldeído glutárico contém um grupamento aldeídico em cada extremidade de sua molécula, sendo capaz de estabelecer pontes entre as unidades proteicas, estabilizando a estrutura quaternária da proteína (Figura 2.1).

O tetróxido de ósmio e o glutaraldeído são os fixadores mais utilizados em microscopia eletrônica porque coagulam as proteínas, causando modificações mínimas na estrutura celular.

Cada um dos fixadores simples apresenta determinados inconvenientes, ao lado de algumas qualidades desejáveis; por isso, foram elaboradas as misturas fixadoras, que contêm pro-

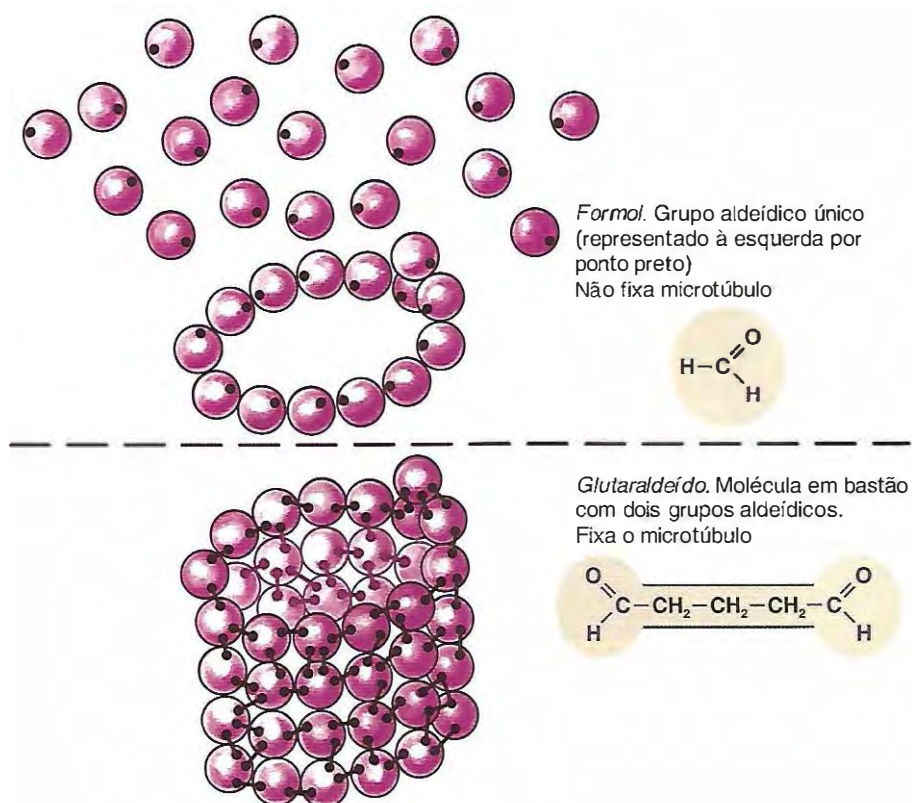
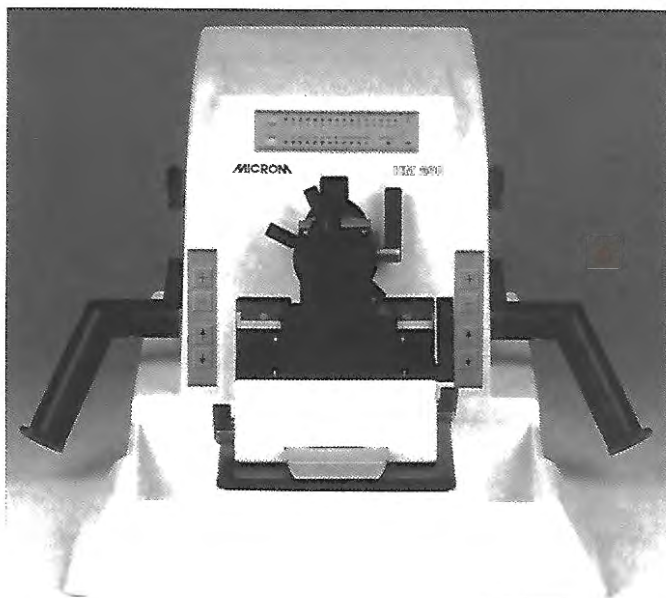



Figura 2.1 ▪ Comparação da atividade fixadora do formol e do glutaraldeído (aldeído glutárico) sobre os microtúbulos, que são constituídos por dímeros proteicos (representados por esferas). Contendo dois grupamentos aldeídicos, cada molécula do glutaraldeído pode ligar-se a dois dímeros proteicos, mantendo a estrutura do microtúbulo. O formol é incapaz de manter essa estrutura, pois cada molécula de formol tem apenas um grupamento aldeído e se prende a um único dímero.

porções variáveis dos fixadores simples com a finalidade de compensar-lhes as deficiências.

▸ **Microtomia.** Em sua maioria, as células fazem parte de tecidos que precisam ser cortados em fatias finas para exame no microscópio. Esses cortes são feitos em um aparelho denominado micrótomo (Figura 2.2). Para ser cortado no micrótomo, o fragmento de tecido fixado é geralmente protegido por um material que o envolve e nele penetra, devendo contar com propriedades físicas que facilitem o corte. Os tecidos destinados ao estudo no microscópio óptico são protegidos, isto é, incluídos em parafina ou em resinas plásticas especiais, e cortados com uma espessura de 1 a 6 micrômetros, geralmente. Para estudo no microscópio eletrônico, os tecidos devem ser incluídos em resinas mais rígidas, como as do tipo epóxi. Os cortes para o microscópio eletrônico são muito finos, medindo 0,02 a 0,1 mm. Os micrótomos que cortam tecidos incluídos em parafina utilizam navalhas de aço, e os que cortam tecidos incluídos em resinas usam navalhas de vidro ou de diamante.

▸ **Coloração.** Quase todas as organelas são transparentes e incolores, o que dificulta seu estudo microscópico. Para vencer essa dificuldade, foram criados numerosos processos de coloração que tornam visíveis os diversos componentes celulares.

A maioria dos corantes comporta-se como base ou como ácido. Nos corantes básicos, o grupamento químico responsável pela cor ou grupamento cromóforo (*cromo*, cor, e *foro*, conduzo) é catiônico. Os cromóforos desses corantes combinam-se com os grupamentos ácidos (aniônicos) das moléculas celulares. Portanto, as moléculas ácidas, como as do DNA e RNA, são basófilas, isto é, têm afinidade pelos corantes básicos. O azul de toluidina e o azul de metileno são exemplos de corantes básicos. A hematoxilina, um corante muito utilizado, comporta-se como corante básico, ligando-se às estruturas basófilas dos tecidos.

Nos corantes ácidos, o cromóforo é aniônico (portanto, com carga elétrica negativa) e tende a se combinar com os componentes celulares básicos, que são eletricamente positivos. Estruturas ricas em grupamentos básicos são acidófilas, por terem afinidade pelos corantes ácidos. Os corantes ácidos, como a eosina, orange G e fucsina ácida, coram as moléculas básicas das proteínas citoplasmáticas.

Microscópio óptico ou microscópio de luz

O microscópio óptico, também conhecido como microscópio de luz (Figura 2.3), compõe-se de uma parte mecânica, que serve de suporte, e uma parte óptica, constituída por três sistemas de lentes: o condensador, a objetiva e a ocular.

A finalidade do condensador é projetar um cone de luz sobre as células que estão sendo examinadas no microscópio. Após atravessar as células, esse feixe luminoso, em formato de cone, penetra na objetiva, a qual projeta uma imagem aumentada, no plano focal da ocular, que, novamente, a amplia. Por fim, a imagem fornecida pela ocular pode ser percebida pela retina (Figura 2.4) como uma imagem situada a 25 cm da lente ocular, ou então pode ser projetada sobre uma tela ou uma chapa fotográfica. A ampliação total oferecida por um microscópio é igual ao aumento da objetiva multiplicado pelo aumento da ocular.

Chama-se poder de resolução de um sistema óptico a sua capacidade de separar detalhes. Na prática, o poder de resolução é expresso pelo limite de resolução, que é a menor distância que deve existir entre dois pontos para que eles apareçam individualizados; por exemplo: duas partículas separadas por 0,3 μm aparecem individualizadas quando examinadas em um sistema óptico com limite resolutivo de 0,2 μm, porém,

Figura 2.2 ▪ Micrótomo moderno, especialmente ergonômico, para cortes de tecidos incluídos em parafina ou em resina plástica. Modelo ErgoStar HM 200. (Ilustração gentilmente cedida pela Microm, empresa do grupo Carl Zeiss.)

Figura 2.3 ▪ Microscópio óptico moderno, binocular, com iluminação embu... (Fotografia cedida pelo fabricante, Carl Zeiss.)

Figura 2.4 ▪ O esquema do microscópio óptico mostra o trajeto dos raios luminosos. (1) base do microscópio, (2) condensador, (3) lente objetiva, (4) cristalino do globo ocular; (A) sistema de iluminação, (B) platina, (C) tubo binocular, (D) globo ocular do observador. (Ilustração cedida pela empresa Carl Zeiss.)

aparecem como uma partícula única quando o limite resolutivo é de 0,5 μm (Figuras 2.5 e 2.6).

O que determina, pois, a riqueza de detalhes da imagem fornecida por um sistema óptico é o seu limite de resolução, e não o seu poder de aumentar o tamanho dos objetos. A propriedade de aumentar apenas tem valor prático se acompanhada de um aumento paralelo do poder resolutivo. O limite de resolução depende essencialmente da objetiva. A ocular não pode acrescentar detalhes à imagem; sua função é apenas aumentar de tamanho a imagem, que é projetada em seu plano de foco pela objetiva.

O limite de resolução depende, sobretudo, da abertura numérica (AN) da objetiva e do comprimento de onda da luz utilizada.

Figura 2.5 ▪ As principais unidades de medida utilizadas em biologia celular são o micrômetro (mm) e o nanômetro (nm). A unidade ângström (Å) deve ser substituída pelo nanômetro. A ilustração mostra a equivalência entre essas unidades, comparando-as também com o milímetro (mm). As *setas* indicam os limites (aproximados) de resolução do olho humano, do microscópio óptico e do microscópio eletrônico.

Figura 2.6 ▪ Este esquema do cone luminoso que penetra em uma objetiva mostra o semiângulo de abertura, que entra no cálculo da abertura numérica (AN).

O limite de resolução (LR) da objetiva é fornecido pela fórmula:

$$LR = \frac{k \times \lambda}{AN}$$

em que k é uma constante estimada por alguns em 0,61 e, por outros, em 0,5, e λ é o comprimento de onda da luz empregada. Na prática, o objeto é iluminado por luz branca, constituída por diversos comprimentos de onda. Para o cálculo do limite de resolução, toma-se o comprimento de onda da faixa do verde-amarelo (0,55 μm), por ser o olho humano mais sensível a essas cores do que a quaisquer outras; portanto, na prática:

$$LR = \frac{0{,}61 \times 0{,}55}{AN}$$

A análise dessa fórmula mostra que o limite de resolução é diretamente proporcional ao comprimento de onda da luz utilizada e inversamente proporcional à abertura numérica da objetiva.

▸ **Microscópio de polarização.** O emprego de um feixe luminoso polarizado permite estudar determinados aspectos da organização molecular dos constituintes celulares. Ao atravessar a célula, o feixe de luz pode passar por estruturas cristalinas ou constituídas por moléculas alongadas e paralelas, que dividem o feixe polarizado em dois, cujos planos são perpendiculares. Essas estruturas são chamadas anisotrópicas e são birrefringentes, pois apresentam dois índices de refração diferentes, conforme a incidência da luz. As estruturas celulares que não apresentam tal organização não modificam o plano de polarização da luz, e são ditas isotrópicas.

O microscópio de polarização é semelhante ao microscópio óptico comum, acrescido de dois prismas ou dois discos polaroides. Um desses elementos é colocado no condensador e funciona como polarizador; o outro é colocado na ocular e é chamado analisador. A função do polarizador é iluminar a célula com um feixe de luz polarizada. O analisador verifica o efeito das estruturas celulares sobre o feixe polarizado.

Quando o polarizador e o analisador estão com seus planos de polarização perpendiculares (cruzados), somente as estru-

turas birrefringentes ou anisotrópicas podem ser vistas. Isso ocorre porque elas dividem o feixe polarizado em dois; um deles é absorvido pelo analisador, mas o outro, perpendicular ao primeiro, atravessa o analisador e forma a imagem. As estruturas isotrópicas não são observadas, pois não desviam o plano de polarização da luz, e o feixe que passa pelo polarizador chega inalterado ao analisador, no qual é retido.

▸ **Microscópio de contraste de fase.** Esse microscópio é dotado de um sistema óptico especial que transforma diferenças de fase dos raios luminosos em diferenças de intensidade. Assim, as diferenças de fase, para as quais o olho não é sensível, tornam-se visíveis, pois são transformadas em diferenças de intensidade luminosa, facilmente perceptíveis (Figura 2.7). O microscópio de contraste de fase pode ser utilizado de modo que as estruturas celulares apareçam escuras (fase positiva) ou claras (fase negativa) – comparar a Figura 2.7C e D.

A velocidade da luz ao atravessar um corpo e o índice de refração deste dependem da quantidade de matéria presente, isto é, da densidade do corpo. Quanto maior for a densidade, menor será a velocidade da luz no interior desse corpo; menor será também o índice de refração.

As diversas estruturas celulares apresentam quantidades diversas de matéria e causam atrasos diferentes na luz que as atravessa. Isso provoca diferenças de fase na luz emergente, que, por interferência, são transformadas em diferenças de amplitude, ocasionando diferenças de intensidade luminosa, às quais a retina é sensível.

O microscópio de contraste de fase é empregado, em especial, para o estudo de células vivas. É de grande utilidade para a observação de células cultivadas, cujos crescimento e divisão mitótica podem ser facilmente seguidos sem o emprego de corantes.

O microscópio idealizado por Normaski é um tipo de microscópio de contraste de fase que se utiliza da luz polarizada. Assim como no microscópio de fase comum, as estruturas celulares se tornam visíveis em razão da interferência dos raios luminosos emergentes (Figura 2.7B).

▸ **Microscópio confocal.** Células isoladas e cortes de tecidos têm espessura maior do que o plano de foco do microscópio óptico. Na prática, as lâminas são examinadas usando-se o artifício de variar o plano de focalização por meio do botão micrométrico do microscópio, o que modifica a distância entre as células e a lente objetiva. Com a movimentação do botão micrométrico, um plano da célula entra em foco, enquanto os outros planos saem de foco. Todavia, esse procedimento tem o inconveniente de oferecer uma imagem do plano focalizado que perde nitidez pela interferência dos raios luminosos que passam pelos planos fora de foco. Na realidade, forma-se uma imagem nítida do plano focalizado e, simultaneamente, a ela está superposta a imagem "borrada" dos outros planos da célula. O microscópio confocal (Figura 2.8) soluciona esse inconveniente do microscópio óptico comum. No microscópio confocal, a iluminação é feita por um delgado feixe de raios *laser*, que varre o corte iluminando apenas, ponto por ponto, um determinado plano da célula, realizando um verdadeiro "corte óptico". A imagem é formada exclusivamente pelas estruturas que estão no plano da varredura, sem que os componentes celulares situados em outros planos contribuam para a formação da imagem. Não somente a imagem é muito nítida, como também a célula pode ser "cortada" durante a microscopia, e as "fatias" obtidas podem ser utilizadas de várias maneiras. Geralmente, as células são submetidas a um composto fluorescente e a luz emitida é processada em um computador, que envia os sinais para formação da imagem na tela de um monitor de vídeo. As imagens dos "cortes ópticos" assim obtidas podem ser armazenadas no disco do computador e utilizadas para construir uma imagem tridimensional, ou para cálculos de comprimento, área, volume e outras análises, de acordo com a finalidade do estudo. Uma vez digitalizadas, as imagens podem ser arquivadas para estudos posteriores.

O microscópio eletrônico possibilitou a visualização de estruturas celulares não visíveis ao microscópio óptico por contar com poder resolutivo muito maior

A capacidade resolutiva de qualquer microscópio é limitada pelo comprimento de onda da radiação empregada. A radiação visível permite distinguir detalhes de 0,2 mm; porém, a forma de objetos menores não é visível.

Recentemente, o microscópio eletrônico foi aperfeiçoado (Figura 2.9); ele emprega feixes de elétrons, que, acelerados por uma diferença de potencial de 60.000 volts, apresentam um comprimento de onda de 0,005 nm. No momento, não se consegue aproveitar inteiramente a capacidade resolutiva dos melhores microscópios eletrônicos em razão das dificuldades em preservar as células e, sobretudo, em obter cortes extremamente finos, imprescindíveis para a resolução máxima.

Os componentes do microscópio eletrônico, representados de modo esquemático, lembram um microscópio óptico (Figura 2.10). Os elétrons são produzidos graças ao aquecimento, no vácuo, de um filamento de tungstênio – o cátodo – que emite elétrons. Essas partículas são aceleradas em razão de uma diferença de potencial de 60 a 100 kV existente entre o cátodo e o ânodo. Este último é uma placa perfurada no centro e só permite a passagem de parte dos elétrons, formando um feixe. Os elétrons passam por uma bobina ou lente magnética, também chamada condensadora, que os dirige em feixe uniforme na direção do objeto. Após atravessar o objeto, no qual muitos elétrons são desviados, o feixe passa por outra bobina, que corresponde à objetiva do microscópio óptico. Por fim, uma terceira bobina projeta os elétrons sobre uma tela fluorescente – na qual eles formam uma imagem visível – ou sobre um filme fotográfico.

Os elétrons desviados por determinadas estruturas da célula em estudo não contribuirão para formar a imagem. Essas estruturas aparecem escuras e são chamadas elétron-densas. Os componentes celulares que desviam uma pequena porcentagem de elétrons aparecerão em diversas tonalidades de cinza.

A tela fluorescente em que a imagem se forma é uma placa revestida por ZnS (sulfeto de zinco), substância que emite luz ao ser excitada pelos elétrons. Na prática, as observações mais cuidadosas são efetuadas nas micrografias obtidas pela retirada da tela do trajeto dos elétrons, os quais incidirão sobre um filme fotográfico. Como as emulsões fotográficas são sensíveis aos elétrons, elas registram a imagem fornecida pelo aparelho.

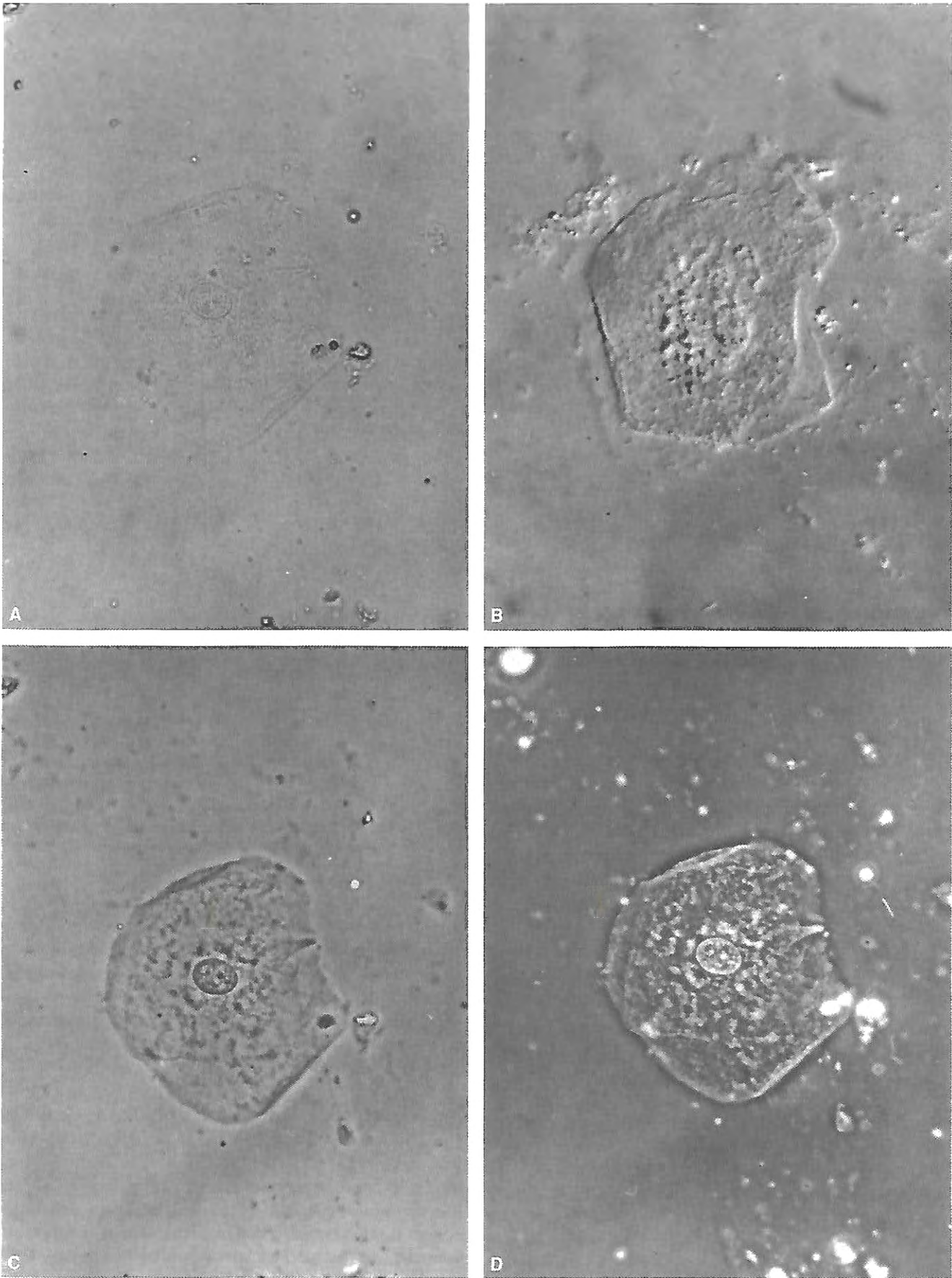



Figura 2.7 ▪ Comparação entre a microscopia comum e três tipos de microscopia de interferência (contraste de fase) na observação de uma célula epitelial sem coloração. **A.** Microscópio comum. **B.** Microscopia interferencial segundo Normasky. **C.** Microscópio de contraste de fase, com fase positiva. **D.** Microscopia de contraste de fase, com fase negativa. (As fotomicrografias foram gentilmente cedidas pelo Professor Raul Machado.)

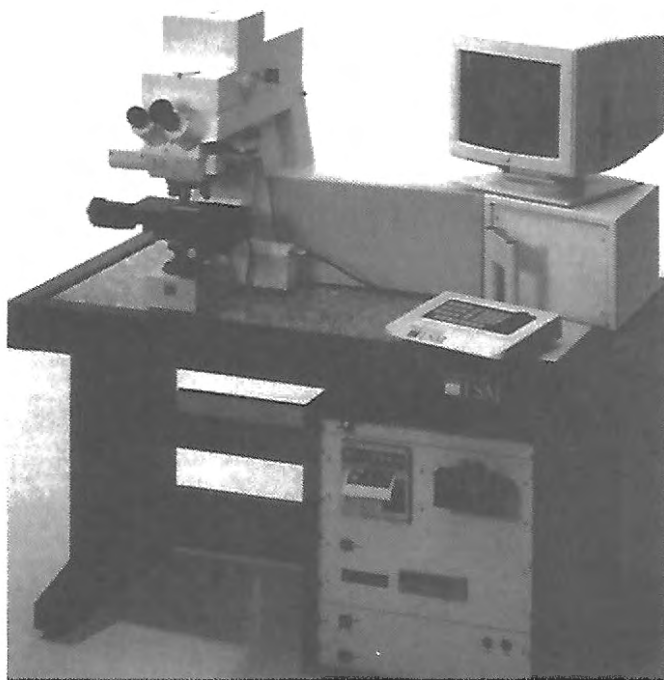



Figura 2.8 ▪ Microscópio confocal Zeiss. (Reproduzido por cortesia do fabricante.)

Depois de revelados, os filmes são ampliados 2 a 4 vezes e as micrografias podem ser examinadas à vontade.

A tela fluorescente, constituída por partículas relativamente grosseiras, emite pouca luz em relação aos elétrons que recebe e fornece imagem menos contrastada do que a obtida nas ampliações fotográficas; por isso, os estudos de microscopia eletrônica são realizados principalmente nas ampliações em papel fotográfico, mais do que diretamente no microscópio eletrônico.

No microscópio eletrônico, todo o trajeto dos elétrons é feito no vácuo, condição necessária para a obtenção de um feixe de elétrons, que seriam desviados ao colidirem com os átomos do ar; por isso, não se podem examinar células vivas, mas apenas células fixadas e completamente secas. Todavia, há aparelhos em que são usados baixo vácuo, os quais podem ser utilizados para exame de material que contém água, embora sem que se possa obter a boa resolução fornecida pelo microscópio eletrônico comum, que é de alto vácuo.

Figura 2.9 ▪ Microscópio eletrônico, modelo EM910 da empresa Carl Zeiss. (Cortesia do fabricante.)

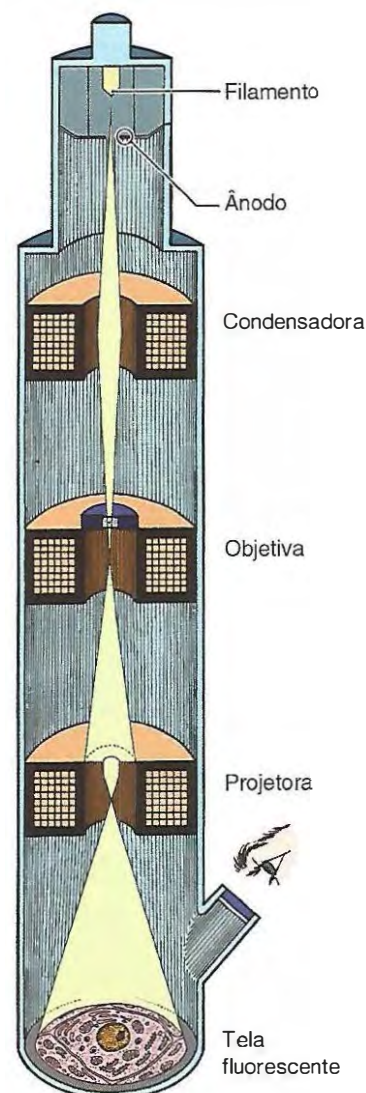



Figura 2.10 ▪ Trajeto dos elétrons no microscópio eletrônico. O corte de tecido é colocado logo acima da bobina ou lente objetiva. A imagem, já aumentada pela objetiva, é novamente ampliada por outra bobina, que a projeta em uma tela fluorescente.

A preparação das células para a microscopia eletrônica requer cuidados muito especiais. A fixação, em geral, é feita em solução de aldeído glutárico (glutaraldeído) tamponado a pH 7,2. Utiliza-se também a fixação em solução de tetróxido de ósmio. Na maioria das vezes, esses dois fixadores são empregados em sequência: primeiro fixa-se o tecido em glutaraldeído e, depois, em ósmio. O ósmio, além de fixador, atua como contraste, por ser um elemento de número de massa elevado, que desvia os elétrons. As estruturas que se combinam com o ósmio aparecerão escuras.

Além do ósmio, outros átomos são empregados para fixar e aumentar o contraste entre os componentes celulares. Após a fixação com aldeído glutárico, seguida da fixação com ósmio,

podem-se passar ainda as células por soluções de sais de urânio ou chumbo. Como as diversas estruturas celulares têm afinidades diferentes por esses metais, o contraste melhora quando mais de um deles é utilizado.

Em razão do fraco poder de penetração dos feixes de elétrons utilizados nos microscópios eletrônicos, as células devem ser cortadas com uma espessura de 20 a 100 nm. Para isso, é necessária a inclusão em resina epóxi. Os cortes são feitos em micrótomos especiais, que utilizam navalhas de vidro fraturado ou de diamante (Figura 2.11).

Além do método de contraste com metais que se ligam aos tecidos, chamados de contraste ou coloração positiva, usa-se também a chamada coloração negativa (Figura 2.12). Na coloração negativa, células, organelas isoladas ou vírus são mergulhados em soluções contendo átomos que desviam os elétrons e, depois, examinados no microscópio eletrônico. O corante negativo fica entre as estruturas e penetra em suas depressões e orifícios, de modo que, ao microscópio, a estrutura aparece clara, contornada por um material elétron-denso, que é o corante. Essa técnica é muito empregada no estudo de vírus e de organelas isoladas.

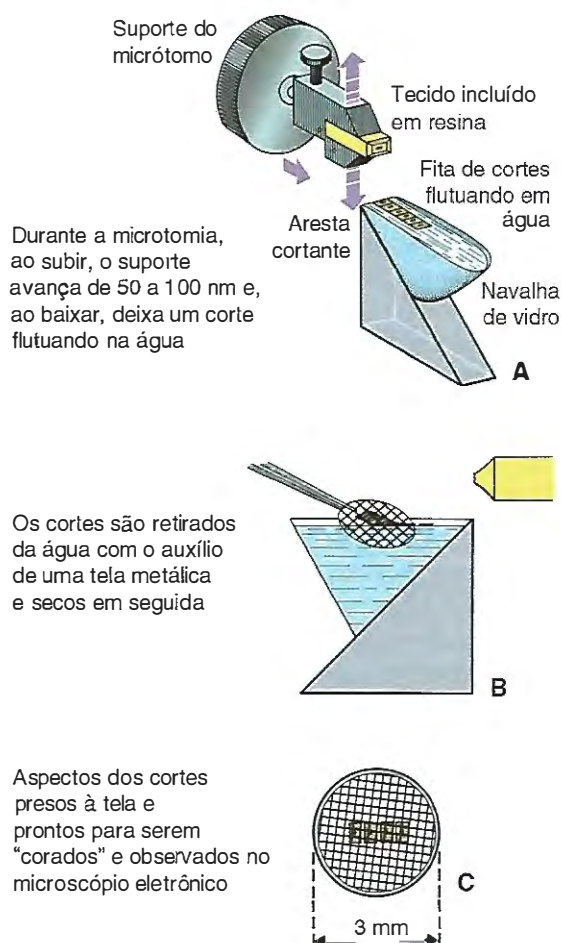



Figura 2.11 ▪ Algumas etapas da obtenção dos cortes para a microscopia eletrônica. Os tecidos são incluídos em blocos de resina epóxi. **A.** Observa-se o suporte do micrótomo com o bloco a ser cortado e a navalha de vidro. Preso à navalha, há um pequeno recipiente contendo água, sobre a qual os cortes serão recolhidos. **B.** Os cortes estão sendo coletados em uma tela de 3 mm de diâmetro, manejada por meio de uma pinça. **C.** Surge a tela com os cortes. Essa tela é submetida à solução de sais de uranila e chumbo, que impregnam os componentes celulares, aumentando seu contraste. Em seguida, a tela é levada ao microscópio eletrônico.

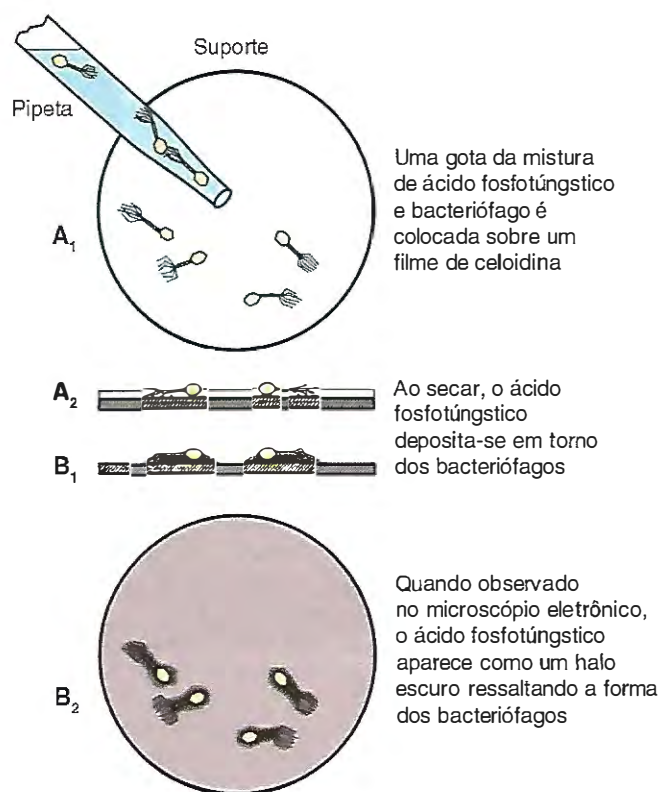



Figura 2.12 ▪ Esquema da técnica de coloração negativa aplicada à evidenciação de bacteriófago (vírus de bactéria), neste exemplo. Com o auxílio de uma pipeta, coloca-se sobre um suporte adequado uma solução de ácido fosfotúngstico contendo bacteriófagos em suspensão (A_1 e A_2). Após a secagem (B_1 e B_2), o ácido fosfotúngstico, que desvia o trajeto dos elétrons, acumula-se em volta dos bacteriófagos. No microscópio eletrônico, os bacteriófagos aparecem claros contra um fundo escuro.

Em determinados casos, sobretudo no estudo dos vírus, utiliza-se também a técnica de sombreamento, em que se faz vaporização de um metal sobre uma estrutura, segundo certo ângulo (Figura 2.13). Como só um lado da estrutura é recoberto pela camada metálica que se deposita durante o processo, sua forma aparece em relevo.

▸ **Microscópio eletrônico de varredura.** Como o microscópio eletrônico comum ou de transmissão, o microscópio eletrônico de varredura também usa um feixe de elétrons. Mas, daí em diante, eles pouco têm em comum e, na verdade, são apa-

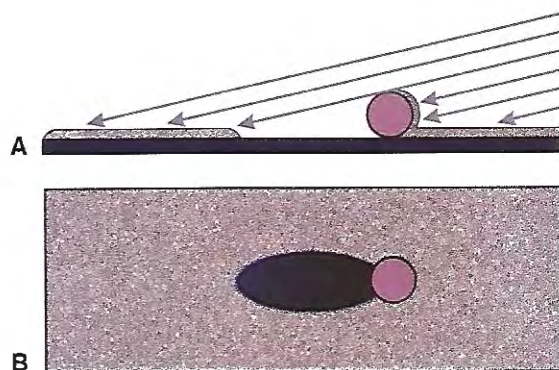



Figura 2.13 ▪ A técnica do sombreamento consiste na deposição de fina camada de metal (ouro, cromo, urânio) sobre a célula em estudo. **A.** O metal é evaporado no vácuo e deve incidir obliquamente sobre o espécime. **B.** Aspecto observado no microscópio eletrônico.

relhos complementares. O microscópio eletrônico de transmissão tem poder de resolução muito maior, enquanto o de varredura tem a vantagem de fornecer imagens tridimensionais, pelo exame da superfície das estruturas.

Basicamente, o microscópio eletrônico de varredura (Figura 2.14) consiste em um sistema análogo ao do microscópio de transmissão, que produz um feixe delgado de elétrons cujo diâmetro pode ser modificado. O trajeto do feixe de elétrons é, em seguida, modificado por um conjunto de bobinas defletoras que o fazem percorrer o espécime ponto por ponto e ao longo de linhas paralelas (varredura).

Ao atingirem o espécime, os elétrons causam diversos efeitos, entre os quais a emissão de elétrons secundários pelo próprio espécime. Os elétrons secundários são coletados por um coletor, passam por um sistema de amplificação e são transformados em pontos de maior ou menor luminosidade, em um monitor de vídeo. As micrografias são obtidas pela fotografia da imagem na tela do monitor, e não pela ação dos próprios elétrons sobre um filme fotográfico, como acontece no microscópio eletrônico de transmissão.

Geralmente, os espécimens não precisam ser cortados para serem examinados no microscópio eletrônico de varredura. Objetos de 1 cm ou mais podem ser examinados inteiros. Em biologia celular, o microscópio de varredura tem sido muito utilizado para o estudo da superfície de células mantidas em cultivo. O material a ser estudado, após fixação em glutaraldeído ou outro fixador, é cuidadosamente dessecado e recoberto por delgada camada condutora de eletricidade – em geral ouro ou platina depositados a vácuo – e está pronto para ser examinado no aparelho.

Figura 2.14 ▪ Esquema geral do microscópio eletrônico de varredura. Na parte inferior do aparelho estão localizadas as bombas de vácuo, pois a coluna percorrida pelos elétrons deve ser mantida em alto vácuo.

▪ Citoquímica: compreende técnicas diversas para a identificação e a localização das moléculas que constituem as células

A citoquímica estuda a localização intracelular das diversas substâncias que compõem as células. Os preparados pela técnica de citoquímica podem ser examinados no microscópio óptico e no microscópio eletrônico. No primeiro caso, o produto da reação citoquímica deve ser corado e, no segundo, deve dispersar os elétrons, isto é, apresentar "elétron-densidade".

Algumas reações citoquímicas seguem a lei de Lambert-Beer, quer dizer, produzem nas células e nos tecidos uma intensidade de cor proporcional à concentração da substância em estudo. Nesses casos, é possível usar um aparelho denominado histofotômetro ou citofotômetro, que permite determinar a intensidade da cor produzida dosando, por esse meio, a quantidade da substância analisada.

▸ **Ácido desoxirribonucleico.** O DNA é demonstrado citoquimicamente pela reação de Feulgen, técnica que consiste em duas etapas. Na primeira, mergulha-se a lâmina com os cortes de tecidos em solução aquecida de ácido clorídrico, o que promove a hidrólise das bases púricas, deixando livres as extremidades da desoxirribose, que contêm radicais aldeídicos. Na segunda etapa, trata-se o preparado pelo reativo de Schiff, que, ao se combinar com os grupamentos aldeídicos da desoxirribose, forma um complexo de cor vermelha. O reativo de Schiff é uma solução de fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso.

A reação de Feulgen é específica para o DNA e, como a intensidade da cor vermelha que se forma é proporcional à concentração de DNA, ela permite o estudo quantitativo desse ácido nucleico. Graças a esse processo, descobriu-se que a quantidade de DNA é fixa para cada espécie e se duplica na intérfase, de modo que, ao entrar na prófase, a célula já contém uma quantidade dupla de DNA.

▸ **Ácido ribonucleico.** O estudo citoquímico do RNA é baseado em sua basofilia e nas propriedades da enzima ribonuclease, que ataca exclusivamente o RNA.

São feitas duas preparações, uma das quais é digerida pela ribonuclease. Depois, as duas preparações são tratadas por um corante básico, como o azul-de-toluidina. Por ser fortemente basófilo, o RNA aparecerá corado. Pela comparação das duas lâminas ao microscópio, torna-se possível detectar o RNA, pois este só aparecerá corado na lâmina que não foi digerida pela ribonuclease.

▸ **Catecolaminas.** O formaldeído reage com as catecolaminas produzindo compostos fluorescentes. Desse modo, é possível a localização

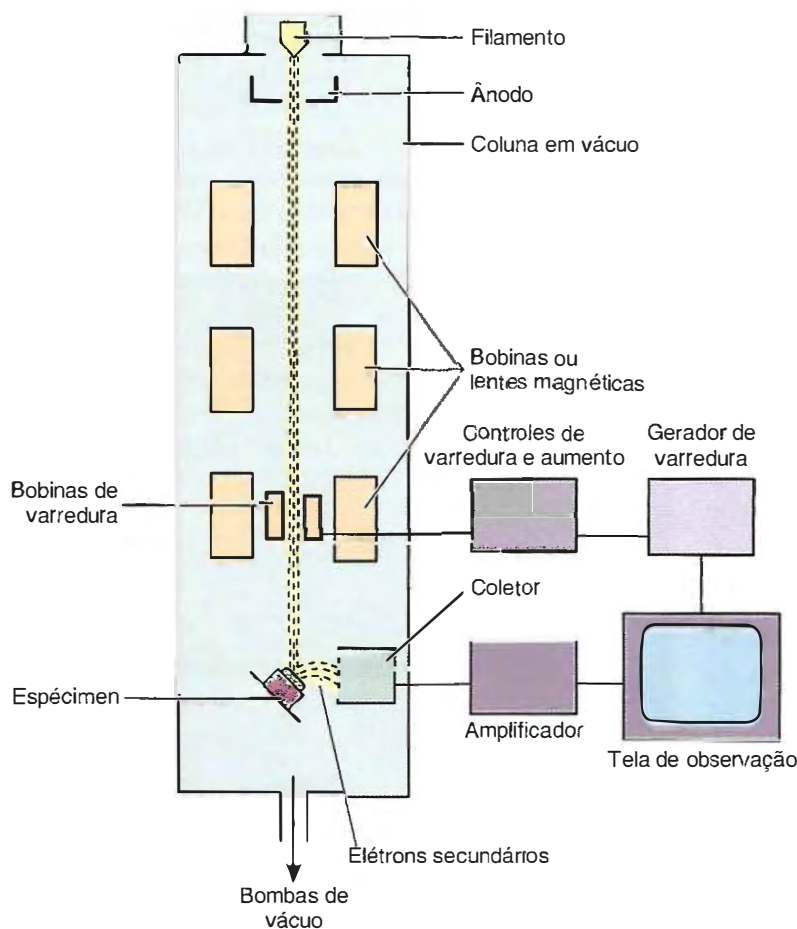
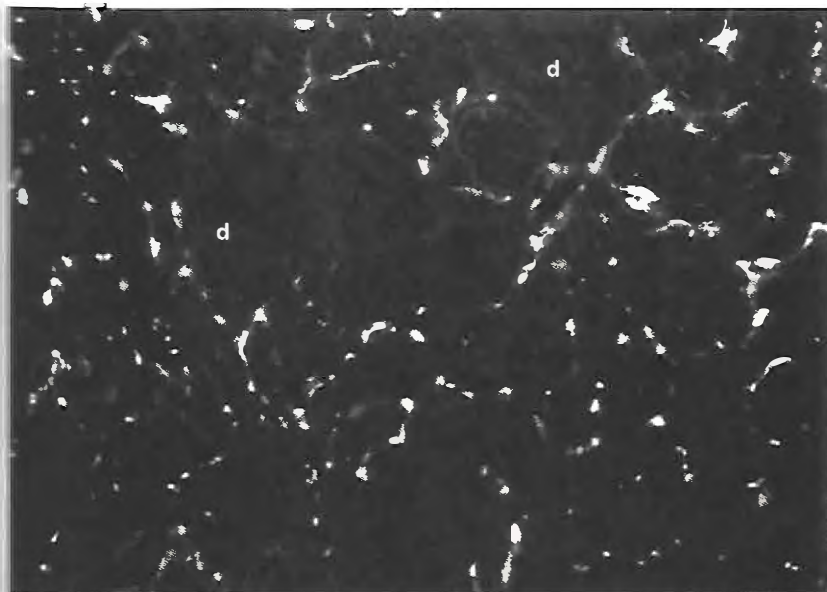



Figura 2.15 ▪ Glândula salivar de sagui. Método de Falck e Hillarp para demonstração de catecolaminas pela fluorescência. Fibras nervosas contendo epinefrina (adrenérgicas) aparecem fluorescentes e localizadas em redor das unidades secretoras. Os ductos (d) são desprovidos de inervação. Aumento: 280 ×. (Cortesia da Dra. Conceição Machado.)

citoquímica das catecolaminas epinefrina e norepinefrina (Figura 2.15).

▸ **Proteínas.** As reações para demonstração das proteínas totais das células são baseadas em técnicas que identificam aminoácidos. Entre essas técnicas estão a de Millon, para tirosina; a do diaminoazobenzeno, para triptofano; e a de Sakaguchi, para arginina.

As diversas proteínas celulares são constituídas pelos mesmos aminoácidos; por isso, as técnicas baseadas na identificação de aminoácidos não permitem individualizar as proteínas, o que pode ser feito com métodos de imunocitoquímica (veja adiante, neste capítulo).

▸ **Polissacarídios.** Um exemplo é a técnica para evidenciar o glicogênio, conhecida como técnica do PAS (*periodic acid Schiff*). Como indica a Figura 2.16, a reação baseia-se na oxidação, pelo ácido periódico, de grupamentos OH adjacentes, formando grupamentos aldeídicos que conferem cor vermelha com o reativo de Schiff. Como foi explicado anteriormente, o reativo de Schiff é a fucsina básica descorada pelo anidrido sulfuroso. A reação não é específica para glicogênio, de modo que se aplica um artifício semelhante ao descrito para a demonstração do RNA: tomam-se duas lâminas com cortes do mesmo tecido, uma das quais é previamente tratada pela enzima alfa-amilase. Essa enzima hidrolisa e remove o glicogênio; portanto, a estrutura que aparecer corada pelo PAS na lâmina não tratada pela alfa-amilase, mas não aparecer corada na lâmina tratada pela enzima é glicogênio.

▸ **Enzimas.** Muitas enzimas podem ser estudadas por técnicas citoquímicas. Algumas vezes, para impedir que o fixador inative a enzima, é preciso usar cortes de tecidos não fixados, obtidos por congelação. As desidrogenases e as fosfatases são exemplos de enzimas demonstráveis citoquimicamente.

As desidrogenases retiram o hidrogênio de um substrato, transferindo-o para outro composto. Existem nas células muitas desidrogenases diferentes, que se distinguem pela natureza do substrato sobre o qual atuam. Chama-se substrato o composto atacado pela enzima. A demonstração citoquímica das desidrogenases é feita pela incubação de cortes de tecidos frescos (não fixados) em uma solução contendo o substrato adequado e um tetrazol. Sob a ação da enzima, o substrato cede hidrogênio, que, então, será fixado pelo tetrazol. Ao ser reduzido pelo hidrogênio, o tetrazol transforma-se em um composto corado e insolúvel, chamado formazana, que se precipita no local em que se processou a reação enzimática. Assim, aparece uma coloração nos locais da célula que têm a desidrogenase específica para o substrato utilizado no meio em que o tecido foi incubado.

As fosfatases ácidas são enzimas que hidrolisam ésteres do ácido fosfórico em pH ácido. Existem diversas técnicas para demonstração dessas enzimas.

Uma das técnicas para as fosfatases ácidas utiliza meio de incubação contendo glicerofosfato de sódio e nitrato de chumbo, em tampão pH 5,0. A enzima hidrolisa o glicerofosfato, formando-se um precipitado insolúvel e incolor de fosfato de chumbo. Em seguida, os cortes são mergulhados em solução de sulfeto de amônia, que transforma o precipitado incolor do fosfato de chumbo em um precipitado negro de sulfeto de chumbo. Como os sais de chumbo são elétron-densos, a reação pode ser vista ao microscópio eletrônico. Essa técnica é utilizada para o estudo dos lisossomos – organelas ricas em enzimas hidrolíticas, entre as quais estão as fosfatases ácidas.

▪ A microscopia de fluorescência é geralmente aplicada com técnicas citoquímicas

As substâncias fluorescentes contam com a propriedade de emitir luz quando excitadas por radiações de determinados comprimentos de onda. Na prática utiliza-se a radiação ultravioleta como excitadora.

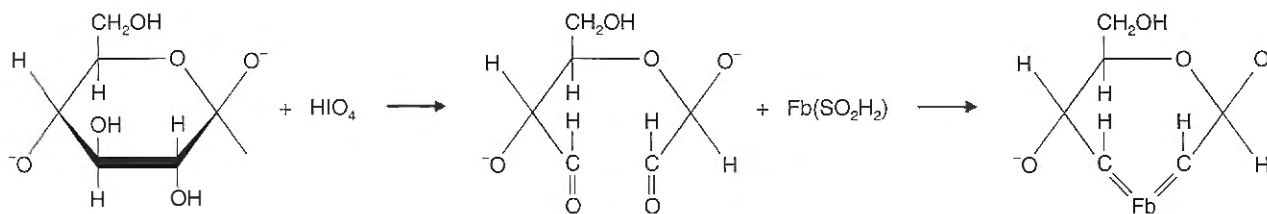



Figura 2.16 ▪ Reação do ácido periódico e reativo de Schiff (reação PAS). Fb, fucsina básica.

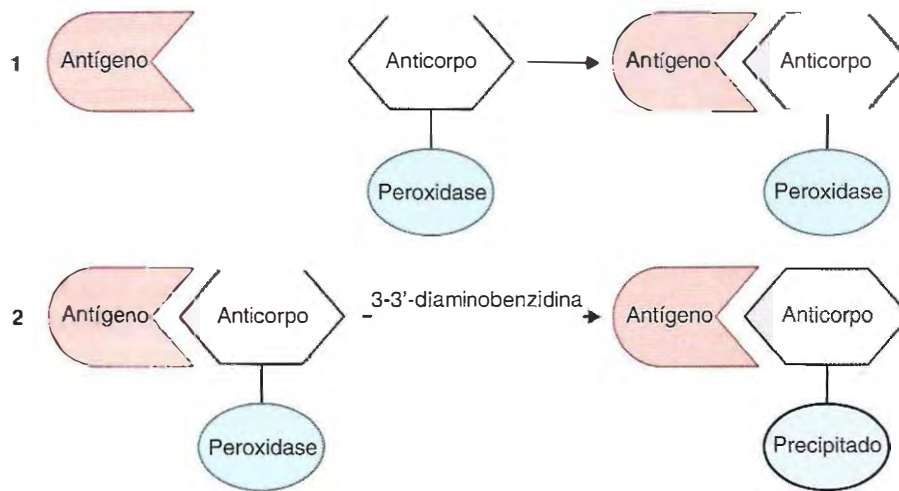



Figura 2.17 ▪ Técnica imunocitoquímica direta. O composto (precipitado) formado pela ação da peroxidase sobre a 3-3'-diaminobenzidina é de cor marrom-clara e elétron-denso. Por isso, a técnica pode ser aplicada tanto à microscopia óptica como à eletrônica.

Alguns constituintes celulares, como a riboflavina (vitamina B_2), a vitamina A e as porfirinas, são fluorescentes e podem ser identificados e localizados por meio da microscopia de fluorescência.

Utilizam-se também corantes fluorescentes que se combinam e identificam determinadas substâncias não fluorescentes normalmente presentes nas células. Um dos corantes fluorescentes mais utilizados é o alaranjado de acridina, que se combina com os ácidos nucleicos, permitindo a sua localização.

Todavia, a principal aplicação da microscopia de fluorescência ocorre em combinação com métodos imunológicos, nas técnicas imunocitoquímicas que utilizam anticorpos conjugados a compostos fluorescentes, e que serão descritas a seguir.

A imunocitoquímica localiza moléculas proteicas específicas

As técnicas de imunocitoquímica permitem o estudo da localização intracelular de proteínas específicas. Ela localiza, com precisão, um determinado tipo de molécula proteica, excluindo todas as outras proteínas existentes nas células.

Como a imunocitoquímica se baseia na reação antígeno-anticorpo, devem-se estudar antes algumas noções básicas dessa reação, cujo estudo detalhado pertence ao domínio da imunologia. Textos de imunologia devem ser consultados para mais esclarecimentos.

▸ **Imunocitoquímica direta.** Suponha-se que, de um determinado órgão de rato, se possa extrair e purificar quimicamente uma proteína, que será chamada proteína X. O problema citoquímico consiste em descobrir em que células ou parte da célula está localizada a proteína X, pois ela foi isolada de um órgão inteiro.

Injetando-se a proteína X (antígeno) em um coelho, este formará uma gamaglobulina (anticorpo) com a propriedade de se combinar exclusivamente com a proteína X, não se combinando com qualquer outra. O anticorpo aparece porque a proteína X pertence a um órgão de rato e, portanto, estranha para o coelho no qual foi injetada.

Algum tempo após a injeção da proteína X no coelho, pode-se obter do sangue desse animal um anticorpo específico contra aquela proteína. Esse anticorpo pode ser, por exemplo, combinado com a enzima peroxidase, que serve como marca. A identificação citoquímica da peroxidase identifica também o anticorpo ligado à enzima.

Colocando-se, sobre um corte do órgão de rato que contém a proteína X, uma solução do anticorpo marcado com a peroxidase, haverá uma combinação do antígeno (proteína X) com seu anticorpo (gamaglobulina anti-X) marcado com peroxidase (Figura 2.17). O complexo antígeno-anticorpo que se forma não é visível ao microscópio óptico nem ao eletrônico, mas irá tornar-se visível se a peroxidase for evidenciada por uma reação citoquímica apropriada.

Essa evidenciação é feita colocando-se sobre o corte uma substância que, sob a ação da peroxidase, forme um composto corado e elétron-denso. No exemplo da Figura 2.17, o composto sobre o qual a peroxidase atua é a 3-3'-diaminobenzidina; ao ser atacada pela peroxidase, a 3-3'-diaminobenzidina transforma-se em um composto insolúvel, marrom-claro e elétron-denso.

Em substituição à peroxidase, pode-se usar, como marcador, um corante fluorescente ligado ao anticorpo (Figura 2.18). Nesse caso, o preparado obtido pela ação do anticorpo sobre o corte que contém o antígeno pode ser imediatamente examinado ao microscópio de fluorescência. Todavia, a peroxidase permite melhor localização, pois o corte pode ser estudado com o microscópio eletrônico e o antígeno localizado, com alta resolução, nas organelas celulares.

Uma terceira maneira de marcar o anticorpo consiste em sua conjugação com ferritina. A ferritina, uma proteína que, em razão do seu alto teor em ferro, é muito elétron-densa, possibilita o estudo da localização de proteínas (antígenos) ao microscópio eletrônico. Essa marcação não serve para o estudo ao microscópio óptico.

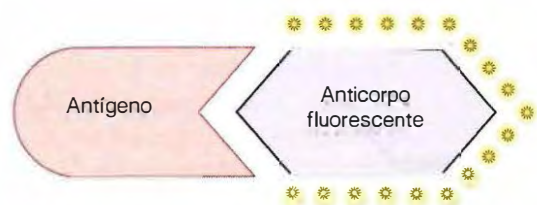



Figura 2.18 ▪ Imunocitoquímica direta com anticorpo fluorescente.

Proteína A do estafilococo. Afinidade pela "perna" do anticorpo
Complexo proteína A + ouro cololidal
Partícula de ouro coloidal
Antígeno celular
Anticorpo. Os "braços" têm afinidade pelo antígeno
Antígeno + anticorpo

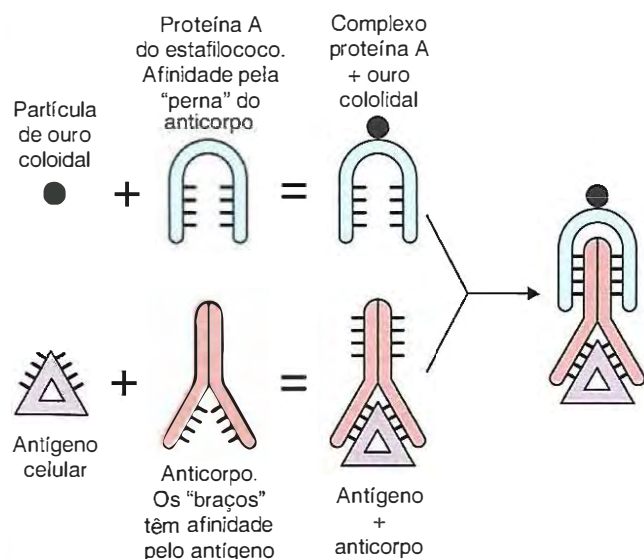



Figura 2.19 ▪ Estes desenhos esquemáticos mostram os fundamentos da técnica de imunocitoquímica, utilizando como marcador o complexo de proteína A (uma proteína de estafilococo) e partículas de ouro coloidal.

Mais recentemente, surgiu a marcação com o complexo de ouro coloidal + proteína A (Figuras 2.19 e 2.20). Essa técnica consiste na adsorção, pelas moléculas da proteína A, de partículas de ouro, muito pequenas (5 a 20 nm) e elétron-densas. A proteína A é extraída das bactérias *Staphylococcus aureus* e, além da afinidade pelo ouro coloidal, tem afinidade por uma região comum às moléculas de todos os anticorpos (segmento Fc). Essa técnica apresenta grande precisão para localizar moléculas proteicas e grande resolução, pois as partículas de ouro coloidal são muito pequenas. O processo pode ser realizado em três etapas:

- incubar o tecido a ser estudado com o anticorpo desejado e lavar; o anticorpo, então, fixa-se à proteína
- incubar o tecido em solução de ouro conjugado à proteína A e lavar
- estudar no microscópio eletrônico.

A técnica direta de imunocitoquímica não é muito sensível e, por isso, pouco utilizada atualmente. Ela foi descrita para facilitar a compreensão da técnica indireta, muito mais útil na prática por sua alta sensibilidade.

▸ **Imunocitoquímica indireta.** Nessa técnica, a marcação é colocada em um antianticorpo, isto é, uma antigamaglobulina. Por sua maior sensibilidade (Figura 2.21), permitindo a demonstração de quantidades mínimas de antígeno, a técnica indireta é a mais utilizada na prática.

As etapas da técnica indireta, que utiliza dois anticorpos, estão esquematizadas na Figura 2.22. Supondo-se que se queira saber a localização celular da proteína Y, também contida em um órgão de rato, a primeira etapa consiste na colocação, sobre o corte de tecido, de uma solução do anticorpo (gamaglobulina) anti-Y, obtido pela injeção da proteína Y em um coelho. Haverá combinação de Y com seu anticorpo.

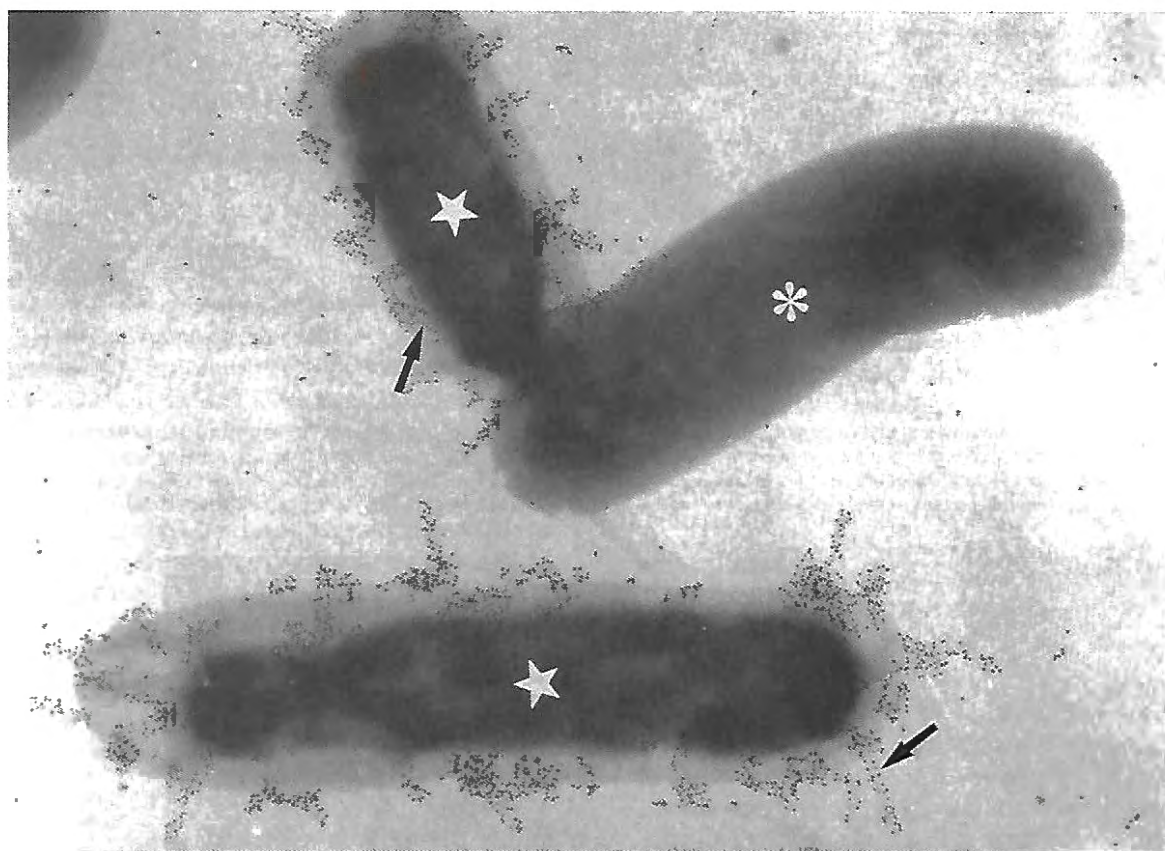



Figura 2.20 ▪ Eletromicrografia de um preparado total da bactéria *Haemophilus aegyptius*, causadora da febre purpúrica brasileira. Notem-se na figura dois tipos celulares, em que as células assinaladas por estrelas mostram projeções filamentosas marcadas pelo complexo proteína A-ouro, ligado a um antissoro policlonal anti 25kD. A proteína 25-kD é uma subunidade proteica da fímbria. A célula assinalada por um asterisco não mostra projeções filamentosas. Observa-se, em algumas oportunidades, a disposição linear (que revela a estrutura filamentosa da fímbria, *seta*) das partículas de ouro elétron-dispersantes, que medem aproximadamente 5 nm de diâmetro. Aumento: 63.000×. (Gentileza da Dra. Hatune Tanaka do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.)

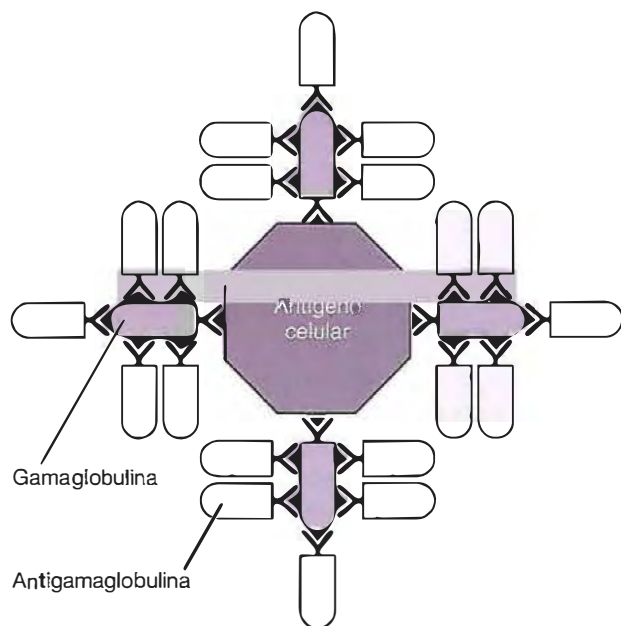



Figura 2.21 ▪ Esquema para demonstrar a maior sensibilidade da imunocitoquímica indireta. Pela técnica direta, esse antígeno celular fixaria quatro moléculas do anticorpo; pela técnica indireta, ele fixou 20 moléculas de antigamaglobulina.

Na segunda etapa, coloca-se sobre o corte uma solução de anticorpo contra gamaglobulina de coelho. Esse anticorpo, que é uma antigamaglobulina e, portanto, um antianticorpo, pode ser obtido pela injeção de gamaglobulina de coelho em carneiro ou cabra.

Por fim, ter-se-á um complexo constituído pela proteína Y, seu anticorpo e uma antigamaglobulina. A antigamaglobulina pode ser evidenciada por conjugação com substâncias fluorescentes (Figura 2.23), ferritina ou peroxidase, conforme foi descrito na técnica direta.

Macromoléculas como proteínas, DNA e RNA podem ser isoladas por cromatografia em coluna

As proteínas e os ácidos nucleicos isolados das células são frequentemente separados pela técnica de cromatografia em coluna. Essa técnica baseia-se no fato de que, quando se faz uma mistura de proteínas dissolvidas em água passar por uma coluna constituída por uma matriz sólida e porosa, contida

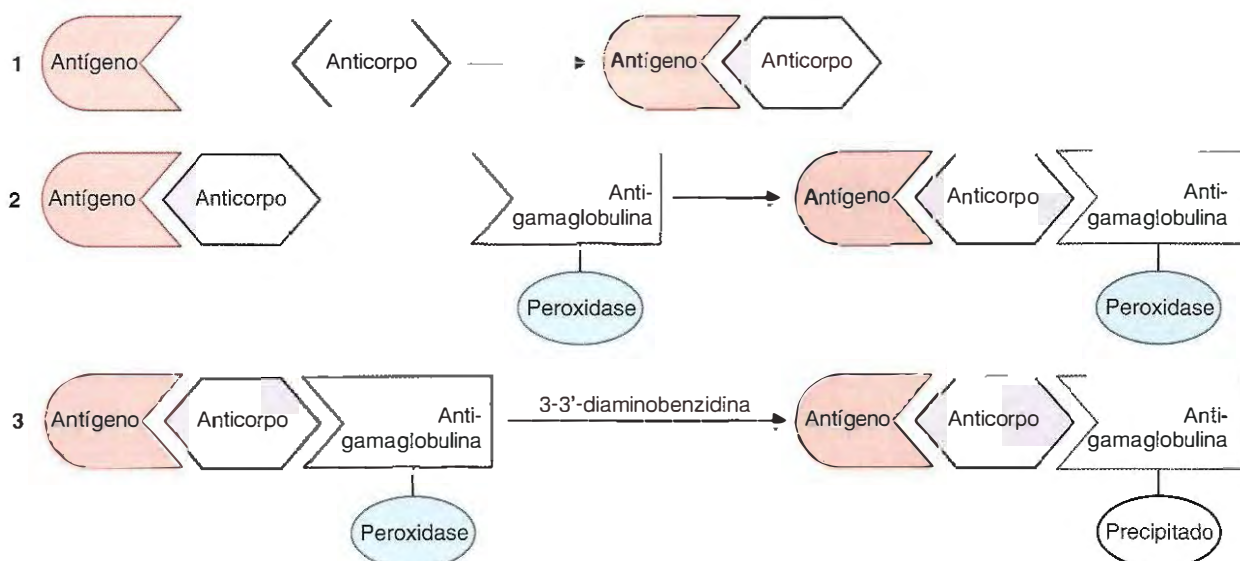



Figura 2.22 ▪ Esquema demonstrativo das etapas da técnica imunocitoquímica indireta. Na etapa **1**, o antígeno cuja localização se deseja determinar combina-se com o anticorpo específico, formando um complexo que não é visível nem no microscópio óptico, tampouco no eletrônico. A finalidade das etapas seguintes é tornar esse complexo visível. Na etapa **2**, agrega-se antigamaglobulina marcada com peroxidase ao complexo já formado. Na etapa **3**, por meio da técnica citoquímica para peroxidase, forma-se precipitado visível nos microscópios óptico e eletrônico, revelando-se assim o local em que está presente o antígeno cuja localização era desejada.

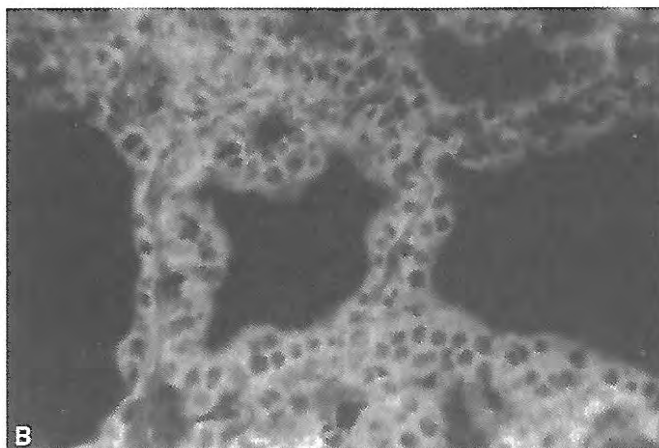
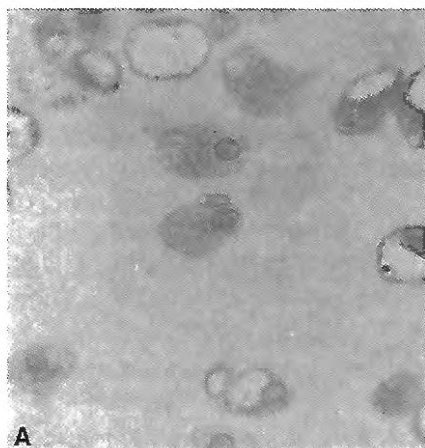



Figura 2.23 ▪ Exemplos da técnica imunocitoquímica indireta. **A.** Células hipofisárias produtoras do hormônio luteinizante. Fotomicrografia no microscópio óptico comum. Aumento: 500×. (Cortesia do Dr. Flávio Fava de Moraes e do Dr. Burton R. Baker.) **B.** Células da glândula tireoide. Fotomicrografia no microscópio de fluorescência. Aumento: 400×. (Cortesia do Dr. Mário Camargo.)

em um tubo de vidro, a velocidade de migração das diferentes proteínas varia conforme a interação de cada uma delas com a matriz. Mandando-se um fluxo contínuo de proteínas, que sai pela parte inferior da coluna, podem-se coletar separadamente as proteínas contidas na amostra inicial.

O grau e o tipo de interação das proteínas com a matriz da coluna podem ser de natureza variável, a saber:

- **interação de troca iônica:** em que a matriz é constituída por partículas com carga positiva ou negativa e na qual a separação das proteínas depende das cargas elétricas na superfície de suas moléculas
- **interação hidrofóbica:** as partículas da matriz apresentam superfície hidrofóbica, retardando a migração das proteínas hidrofóbicas, que têm afinidade pelas partículas da matriz
- **filtração em gel:** nesse caso, a matriz atua apenas como uma peneira, por onde as proteínas migram com velocidade variável, dependendo do tamanho e da forma de suas moléculas
- **interação por afinidade:** muitas moléculas biológicas interagem com alto grau de especificidade, como acontece entre as enzimas e seus substratos, entre determínados segmentos de DNA e RNA e entre antígenos e anticorpos. A técnica é, por exemplo, muito utilizada para purificação de anticorpos. Nesse procedimento, as moléculas (anticorpos) ligam-se às partículas da matriz que contêm o respectivo antígeno. As outras proteínas passam pela coluna, mas os anticorpos se prendem à matriz com alta especificidade e afinidade. Posteriormente à passagem das outras proteínas, o anticorpo é removido da coluna, por meio de solução apropriada.

O tamanho das moléculas proteicas pode ser determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em gel tem diversas variantes, para esclarecer diferentes problemas. Uma dessas variantes é empregada para determinar o tamanho das moléculas proteicas e consiste na dissolução das proteínas em solução de sódio *d*odecil sulfonato (SDS). Esse composto é um detergente forte, cujas moléculas são carregadas negativamente. Na presença de um excesso de moléculas negativas de SDS, todas as moléculas proteicas se tornam também negativas, porque todas as cargas positivas das proteínas são neutralizadas. Além disso, adiciona-se um agente redutor, geralmente mercaptoetanol, que rompe as ligações S-S das subunidades proteicas, destruindo a forma original das moléculas de proteínas, que pode ser muito complexa. Colocando-se a mistura de proteínas sobre o gel e submetendo-se este a um campo elétrico, todas as moléculas proteicas migrarão na direção do polo positivo, e a velocidade dessa migração dependerá exclusivamente do tamanho da molécula de cada cadeia polipeptídica, pois todas as proteínas terão a forma alongada.

A radioautografia é muito empregada para se estudar os locais de síntese e o destino de macromoléculas

A radioautografia pode ser aplicada como uma técnica citoquímica para a detecção de isótopos radioativos. Baseia-se na sensibilidade das emulsões fotográficas às radiações ionizantes. Como não existem átomos radioativos nas células, podem-se seguir, pela radioautografia, a incorporação e a migração de compostos radioativos introduzidos nas células com finalidades experimentais.

Por exemplo, desejando-se saber quais as células de um tecido que estão sintetizando DNA, injeta-se em um animal um precursor desse ácido nucleico, a timidina radioativa marcada com trício (H^3). A timidina será incorporada apenas nos núcleos celulares que estiverem sintetizando DNA.

Cobrindo-se a lâmina que contém cortes do tecido, com uma emulsão fotográfica, esta será impressionada pelos núcleos celulares radioativos (partículas beta emitidas pelo trício). Revelando-se a emulsão, aparecerão grânulos negros de prata metálica sobre o núcleo celular cujo DNA foi sintetizado com a timidina-H^3. Depois de revelada a emulsão, as células podem ser coradas para facilitar seu estudo ao microscópio. A emulsão fotográfica é basicamente uma suspensão de microcristais de brometo (ou outro halogeneto) de prata em gelatina. Os cristais de brometo de prata são os detectores da radioatividade.

A radioautografia pode ser aplicada também ao microscópio eletrônico. O processo é basicamente o mesmo utilizado para o microscópio óptico; porém, os grânulos de prata em geral aparecem como filamentos enovelados em razão do maior poder de resolução do microscópio eletrônico.

Das diversas técnicas radioautográficas, a mais empregada em biologia celular é a técnica da emulsão líquida. Essa técnica emprega emulsões fotográficas especiais, sob a forma de um gel que se torna líquido à temperatura de 45°C. As etapas são as seguintes (Figuras 2.24 e 2.25):

- Mergulha-se a lâmina contendo as células radioativas na emulsão fundida a 45°C
- Remove-se com papel absorvente a emulsão do verso da lâmina e deixa-se secar à temperatura ambiente
- Colocam-se os preparados em caixas à prova de luz, para o período de exposição, durante o qual a radiação irá atuar sobre a emulsão
- Após a exposição, revela-se a emulsão fotográfica, tratando-se a lâmina como se fosse uma pequena chapa fotográfica
- Em seguida, as células são coradas e examinadas ao microscópio. Grânulos negros de prata metálica indicarão as partes radioativas das células.

A radioautografia é muito utilizada para o estudo da síntese de diversas moléculas. Para isso, como no exemplo do DNA já citado, injeta-se em um animal ou coloca-se no meio de cultura de células um precursor radioativo da substância que se deseja estudar.

Para o estudo do RNA, pode-se usar adenina ou uridina (Figura 2.26) e, para o estudo da síntese e migração de proteínas, empregam-se aminoácidos. Em geral, as moléculas radioativas utilizadas nesses experimentos são marcadas com hidrogênio (H^3), carbono (C^{14}) ou enxofre (S^{35}). Esses três isótopos emitem partículas beta (elétrons) de fraco poder de penetração, de modo que não causam dano às células. Para estudar o metabolismo normal, é preciso utilizar radiação fraca para que não haja alteração do funcionamento celular pela radiação. Outros isótopos radioativos também muito utilizados em radioautografia são o I^{131}, I^{125} e P^{32}.

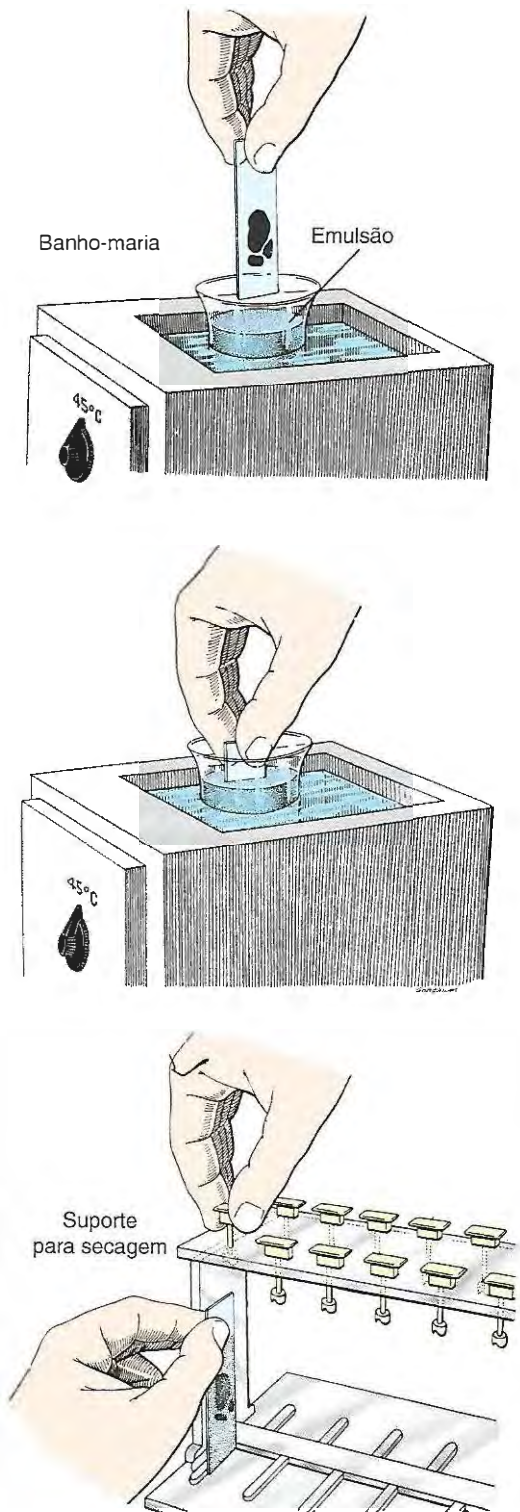



Figura 2.24 ▪ Técnica radioautográfica com emulsão líquida. As etapas demonstradas nestes desenhos são executadas na câmara escura, com luz vermelha de segurança.

▪ Por centrifugação é possível obter organelas celulares em estado de pureza e, em seguida, estudar suas propriedades químicas, físicas e biológicas

As técnicas que permitem o fracionamento celular e a obtenção de frações relativamente puras de organelas contribuíram muito para o desenvolvimento da biologia celular nos últimos anos.

As organelas são separadas pela centrifugação de um homogeneizado de células em que as membranas plasmáticas são rompidas e os constituintes celulares dispersos em um meio líquido, geralmente contendo sacarose. Esse glicídio é muito utilizado porque mantém a integridade dos componentes celulares e evita a tendência de as organelas aglutinarem-se quando as células se rompem.

A ruptura das membranas plasmáticas para a obtenção do homogeneizado em geral é feita pela ação mecânica de um pistão girando em um cilindro que contém as células na solução de sacarose (Figura 2.27). Pode ser feita também por meio de ultrassom ou de um aparelho parecido com um liquidificador doméstico.

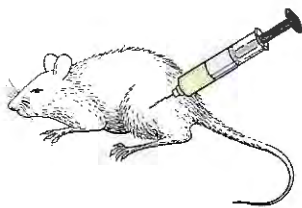
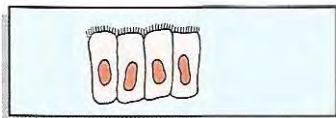
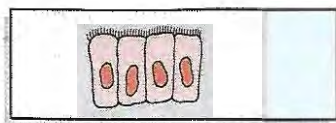
Durante a homogeneização e as centrifugações que se seguem, a maioria das organelas mantém sua forma intacta. Todavia, o reticulo endoplasmático se rompe, e, como suas membranas tendem a se soldar, formam-se vesículas lisas ou granulares, conforme se trate do retículo endoplasmático liso (REL) ou do rugoso (RER). As vesículas formadas a partir deste último, cuja superfície é carregada de ribossomos, recebem a denominação de microssomos. Portanto, os microssomos são fragmentos do retículo endoplasmático rugoso.

O isolamento de uma organela por meio da centrifugação depende do seu coeficiente de sedimentação, isto é, do seu tamanho, sua forma e densidade, bem como da densidade e viscosidade da solução em que está sendo centrifugada.

A separação de componentes celulares por centrifugação em geral é efetuada pela técnica conhecida por centrifugação fracionada ou centrifugação diferencial, que consiste em uma série de centrifugações a velocidades crescentes (Figura 2.27). As organelas ou inclusões maiores e mais densas sedimentam primeiro, e o sobrenadante de cada centrifugação é centrifugado de novo, porém com maior velocidade. Desse modo, os componentes celulares vão sendo sucessivamente separados, como mostra a Figura 2.27.

As frações assim preparadas muitas vezes contêm mais de um componente celular, mas podem ser purificadas por ressuspensão e nova centrifugação. Por exemplo, a fração das mitocôndrias quase sempre contém lisossomos e peroxissomos, mas as três organelas podem ser separadas por novas centrifugações.

Em geral, o sobrenadante que permanece após a última centrifugação é denominado fração solúvel.

Outra técnica de fracionamento celular é a centrifugação contragradiente, em que as partículas são separadas por suas diferenças de densidade. O gradiente consiste em uma solução – que pode ser de sacarose – cuja concentração é máxima na parte profunda do tubo de centrifugação e mínima na superfície. Existe, portanto, no tubo, um gradiente de densidade crescente de cima para baixo. Logo após ter sido preparado o gradiente, coloca-se o homogeneizado sobre sua superfície e faz-se a centrifugação. Impulsionadas pela força centrífuga, as partículas penetram no gradiente. Cada tipo de partícula para no local em que há equilíbrio entre a força centrífuga da partícula e a concentração do gradiente (Figura 2.28).

Injeta-se timidina-H^3 em um animal que será sacrificado uma hora depois. As células que estiverem sintetizando DNA incorporarão a timidina radioativa injetada.

Os tecidos são fixados, incluídos em parafina ou resina, cortados no micrótomo e presos em lâmina histológica.

Na câmara escura, a lâmina é coberta com delgada camada de emulsão fotográfica e guardada em caixa à prova de luz por alguns dias ou meses, para que a radioatividade atue na emulsão (exposição).

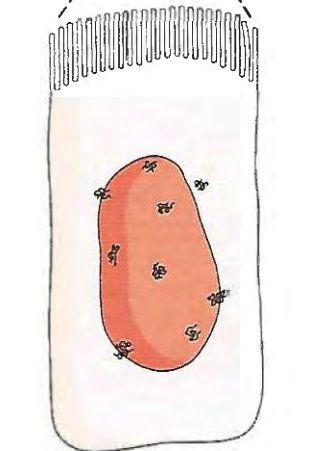
Após esse período, a lâmina é **revelada**, aparecendo grânulos negros de prata sobre os núcleos radioativos.
Conclusão: das três células, apenas uma estava sintetizando DNA no momento da injeção de timidina-H^3.

O mesmo processo pode ser executado para microscopia eletrônica. Nesse caso é necessário incluir o tecido em resina, fazer cortes ultrafinos e colocá-los nas telas apropriadas, e não em lâminas.
Em razão da grande resolução do microscópio eletrônico, os grânulos de prata geralmente aparecem como filamentos enovelados.

Figura 2.25 ▪ Esquemas das diversas fases da técnica radioautográfica. Tomou-se como exemplo o estudo da síntese de DNA pela injeção de timidina radioativa.

As frações obtidas por qualquer técnica de fracionamento devem ser examinadas quanto à sua pureza. Para isso, podem ser empregados os microscópios ópticos e eletrônico ou métodos bioquímicos que demonstram na fração a predominância de um composto que lhe é característico; por exemplo, a fração dos lisossomos apresenta quantidade muito elevada de fosfatase ácida, enquanto a fração nuclear é muito rica em DNA.

Uma vez isoladas, as organelas e as inclusões podem ser estudadas por diversos métodos. Sua composição química pode ser determinada e sua atividade metabólica estudada fora da célula e, portanto, em um meio rigorosamente controlado. Isoladas, as organelas não estão mais sujeitas aos mecanismos intracelulares de controle, de modo que seu funcionamento pode ser testado mais livremente pelo experimentador, embora as condições sejam artificiais, em comparação com o meio intracelular.

É possível separar as células de um tecido e isolar um determinado tipo celular

Vários procedimentos possibilitam a separação das células que constituem os tecidos. A primeira etapa geralmente consiste na destruição da arquitetura da matriz extracelular (por meio de enzimas como colagenase e tripsina) e das junções que unem as células, muito frequentes nos epitélios glandulares e de revestimento. Para isso, é preciso retirar os íons Ca^{2+}, que participam da aderência entre as células, com auxílio do EDTA (*ethilenediaminetetraacetic acid*) que capta os íons Ca^{2+} removendo-os do meio. Depois de separadas, as células continuam misturadas, e os tipos celulares desejados precisam ser isolados.

O isolamento das células pode ser feito de diversas maneiras. Elas podem ser isoladas por centrifugação, de acordo com

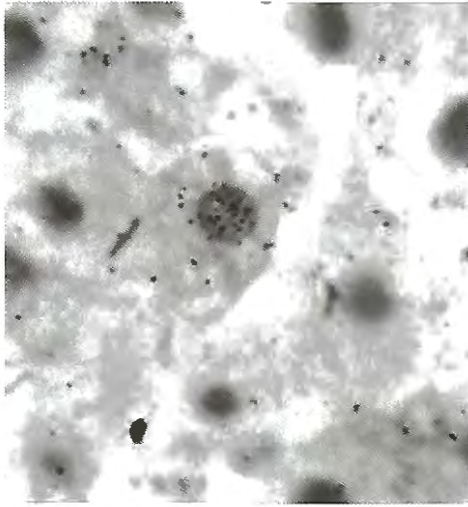



Figura 2.26 ▪ Células hepáticas incubadas durante 1 h em solução nutritiva contendo uridina-H^3. Esse nucleosídio é utilizado pela célula para fabricar RNA. Notar a predominância dos grânulos de prata sobre o núcleo celular, indicando síntese de RNA. Coloração pela hematoxilina-eosina. Aumento: 1.500×.

Célula
Homogeneização
Homogeneizado
Gravidade 20 min
1.000 G 20 min
Células intactas e fibras
Núcleos
10.000 G 20 min
Mitocôndrias e lisossomos
105.000 G 120 min
Microssomos
Desoxicolato de sódio 0,26%
105.000 G 20 min
Retículo endoplasmático
Ribossomos

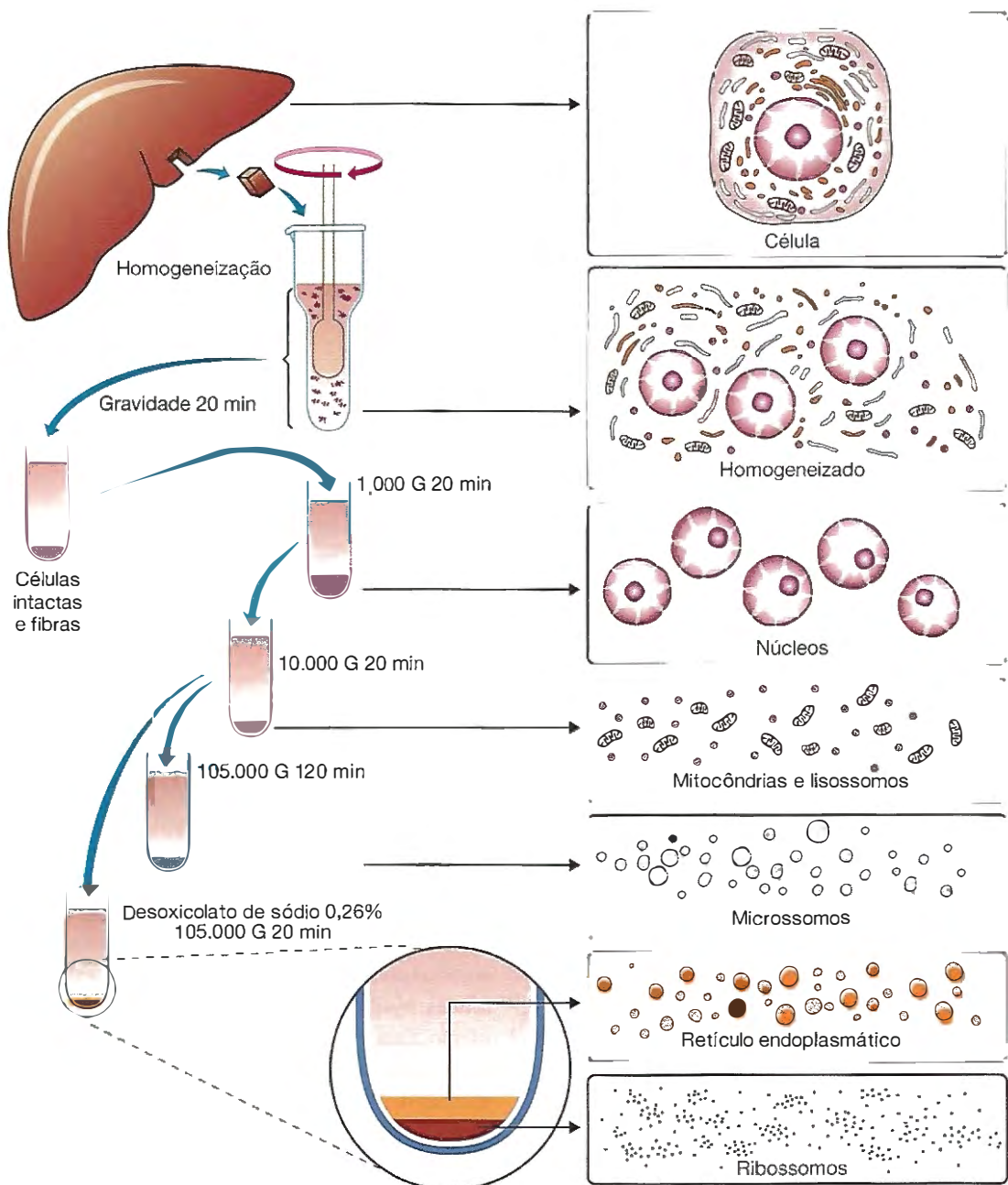



Figura 2.27 ▪ Esquema da técnica de centrifugação diferencial. O sobrenadante de cada tubo é centrifugado novamente, cada vez com maior força centrífuga. Os desenhos da direita mostram os componentes celulares do sedimento de cada tubo. A força centrífuga é representada por G; 1.000 G significa 1.000 vezes a força da gravidade.

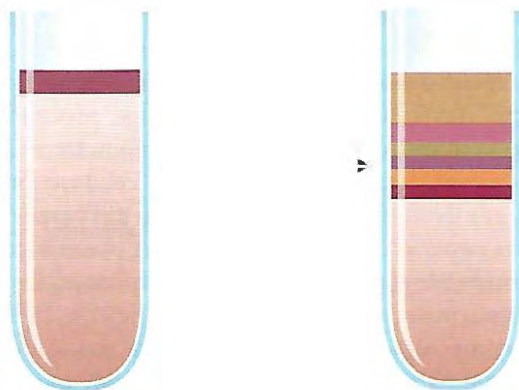



Figura 2.28 ▪ Centrifugação contra gradiente. *À esquerda*, antes da centrifugação, com a amostra colocada sobre o gradiente de concentração de sacarose. *À direita*, após a centrifugação, mostrando as faixas, cada uma delas contendo, geralmente, um tipo de organela.

seu tamanho e sua densidade. Determinadas células, como os macrófagos, têm tendência para aderir ao vidro e a plásticos e, assim, podem ser isoladas das células que não têm essa tendência. Contudo, a maneira mais precisa e eficiente de isolar um único tipo celular em grande quantidade é pelo uso de um aparelho denominado FACS (*fluorescence-activated cell sorter*). As células em suspensão são tratadas com um anticorpo fluorescente que se ligue especificamente à superfície de determinadas células. À medida que a suspensão de células passa pelo aparelho, as células fluorescentes são desviadas para um recipiente, enquanto as não fluorescentes serão coletadas em outro recipiente.

Estudo de células vivas e culturas de células animais e vegetais

As células retiradas do corpo de um animal ou de uma planta podem ser estudadas, por algum tempo, enquanto estão vivas. Para isso elas devem ser colocadas em meio isotônico, que não lhes causa alteração de volume. Como quase sempre os constituintes celulares são incolores e transparentes, torna-se necessário o uso do microscópio de contraste de fase. Em alguns casos, podem-se empregar corantes supravitais, que são pouco tóxicos e penetram na célula viva, corando determinadas estruturas. Um corante supravital bastante empregado é o verde-jano, que cora as mitocôndrias.

Quando se quer estudar células vivas por tempo mais longo, costuma-se cultivá-las em soluções nutritivas (meios de cultura), em que o comportamento e metabolismo celulares são estudados em condições mais bem definidas do que no corpo de um animal. As culturas possibilitam o estudo dos movimentos celulares, da mitose, da ação de diversas substâncias sobre as células e da secreção, pela célula, de produtos que irão acumular-se no meio de cultura.

As culturas são feitas principalmente em frascos, com células isoladas dos tecidos pela aplicação de diversas técnicas, como foi mencionado anteriormente. A maioria das células não vive em suspensão em meio líquido, necessitando de uma superfície sólida sobre a qual crescem e se dividem. Essa superfície pode ser a própria parede dos frascos de plástico em que são feitos os cultivos; porém, a maioria das células não adere à parede do frasco, a não ser que esta esteja recoberta por moléculas teciduais extracelulares, como o colágeno. O cultivo em frasco possibilita o emprego de meios de cultura quimicamente definidos, constituídos por aminoácidos, glicídios, sais minerais, vitaminas e fatores de crescimento, que são proteínas específicas, estimuladoras da proliferação e diferenciação de determinados tipos celulares. Um exemplo é o fator de crescimento para células nervosas ou NGF (*nerve growth factor*). Na ausência desse fator, não se podem cultivar células nervosas.

As células retiradas do corpo de um animal e cultivadas diretamente constituem as culturas primárias. Em geral, as células das culturas primárias morrem após certo número de mitoses (50 a 100 mitoses), mas, às vezes, algumas células sofrem mutação e se tornam imortais, isto é, multiplicam-se indefinidamente, constituindo as culturas secundárias. As células imortais formam as linhagens celulares, que não são constituídas de células inteiramente normais, pois sofreram alguma mutação, sendo chamadas células transformadas. Todavia, elas conservam muitas características das células normais, sendo muito utilizadas em diversos experimentos.

As linhagens derivadas de células transformadas *in vitro* ou de células cancerosas apresentam determinadas particularidades; por exemplo, elas podem crescer sem se prenderem à parede do frasco e multiplicam-se muito mais do que as células normais, atingindo uma densidade populacional maior.

Graças à dissociação, combinada com engenhosas técnicas de isolamento celular, foi possível a obtenção de cultivos de clones derivados de uma única célula. As células desses clones podem expressar muitas de suas especializações funcionais.

Os cultivos vêm sendo utilizados para estudos do metabolismo de células normais e cancerosas e, além disso, têm sido valiosos para experiências com vírus, que só se multiplicam no interior das células. Alguns protozoários foram estudados, também, em culturas de células por se desenvolverem no citoplasma.

Na citogenética, as culturas celulares são de grande utilidade, facilitando muito o estudo dos cromossomos de células vegetais e animais. A determinação de cariótipos humanos (estudo do número e morfologia dos cromossomos de uma pessoa) é geralmente feita em culturas de células do sangue.

Quando se generalizou o emprego de culturas de células para cultivar vírus, observou-se que alguns vírus têm moléculas fusogênicas, com a propriedade de induzir as células a se fundirem, formando células binucleadas e células multinucleadas (sincícios), mesmo quando se trata de células de animais de espécies diferentes. Formam-se assim células com cromossomos de espécies diferentes, denominadas heterocários.

Os heterocários têm sido utilizados para o estudo da fisiologia do núcleo celular e, principalmente, dos efeitos do citoplasma sobre o núcleo.

O vírus Sendai, do grupo dos mixovírus, é o preferido para a obtenção de heterocários. Esse vírus, que causa no homem uma doença parecida com a gripe, foi isolado pela primeira vez em Sendai, no Japão, daí recebendo o nome. Os vírus inativados pela radiação ultravioleta não perdem a propriedade de

promover a fusão das células, sendo preferidos para se obter heterocários, pois assim não há proliferação viral, o que dificultaria a observação dos fenômenos celulares.

Nos heterocários binucleados, os núcleos geralmente entram em mitose de modo sincrônico; mas, como se forma um único fuso, o resultado são duas células-filhas, cada uma com um núcleo constituído por cromossomos de ambos os núcleos iniciais do heterocário. Desse modo, formam-se células mononucleadas, mas que contêm cromossomos de espécies animais diferentes. Essas células podem multiplicar-se numerosas vezes, embora frequentemente ocorra a eliminação de algum cromossomo em cada divisão, havendo tendência para permanecerem os cromossomos de uma espécie, enquanto os da outra vão sendo parcialmente eliminados.

O heterocário formado pela fusão de células HeLa, que sintetizam DNA e RNA, com eritrócitos de galinha – os quais não sintetizam DNA e quase não sintetizam RNA – forneceu importantes resultados quanto aos efeitos do citoplasma sobre o núcleo. O estudo desse heterocário é facilitado pela lise que o vírus provoca no eritrócito de galinha. Destruindo a membrana do eritrócito, o vírus isola o núcleo dessa célula, que penetra no citoplasma da célula HeLa. A célula HeLa é uma linhagem celular obtida a partir de um carcinoma uterino humano. Uma vez que o citoplasma do heterocário deriva exclusivamente da HeLa, qualquer modificação no núcleo do eritrócito só pode ser promovida pelo citoplasma da célula HeLa. Observa-se que, após penetrar na HeLa, o núcleo do eritrócito, que é condensado, aumenta de volume e sua cromatina se torna frouxa, conferindo ao núcleo um aspecto claro. Ao mesmo tempo, esse núcleo adquire a capacidade de sintetizar DNA e RNA. Esse experimento demonstra que a atividade sintética do núcleo e sua capacidade de multiplicar o material gênico são influenciadas pelo citoplasma.

Muitos tipos de células vegetais também podem ser mantidas em meios de cultura, nos quais crescem e se multiplicam, como o fazem as células animais (Capítulo 13). A separação das células dos vegetais exige procedimentos diferentes. Inicialmente, é necessário submeter as células à ação da enzima celulase, que digere a celulose, principal constituinte de suas paredes. A destruição das paredes libera as células envoltas apenas pela membrana plasmática e que, nessa condição, são denominadas protoplastos. Os protoplastos podem ser cultivados em meios de cultura adequados, de composição química definida, que possibilitam que eles cresçam e se dividam por mitoses. Quando as condições da cultura são adequadas, os protoplastos, depois de diversas divisões mitóticas, acabam formando pequenos agregados de células indiferenciadas. Esses agregados podem ser induzidos a originar plantas inteiramente novas, indicando que as células vegetais são totipotentes, o que não acontece com as células animais. Essa propriedade das células vegetais cultivadas de dar origem a um novo indivíduo completo (planta) é inexistente nas células animais e tem sido utilizada na agricultura.

As células vivas, animais e vegetais, podem ser submetidas a diversas técnicas de microcirurgia que utilizam instrumentos com extremidades de dimensões microscópicas. Entre esses instrumentos, geralmente feitos de vidro, estão agulhas de diversas formas, bisturis, pipetas e eletrodos. Por meio da microcirurgia, é possível proceder à determinação do pH intracelular, ao deslocamento e remoção de organelas e vesículas, ao transplante de partes de uma célula para outra e à remoção, por seccionamento, de fragmentos celulares. A microcirurgia é feita com aparelhos especiais, denominados micromanipuladores, que proporcionam movimentos muito precisos e delicados.

Resumo

Os conhecimentos sobre as células progridem à medida que as técnicas de investigação se aperfeiçoam. O surgimento de um novo instrumento de trabalho, ou a aplicação mais engenhosa de um aparelho já existente, leva sempre a novas descobertas e à elucidação de algumas funções celulares. O estudo da célula começou com o microscópio óptico ou de luz, que, já em 1896, alcançava grande eficiência graças às primeiras objetivas de grande resolução. O emprego desse aparelho em combinação com a descoberta de técnicas de microtomia e coloração permitiu o estudo morfológico das células com grandes detalhes. O microscópio óptico tem evoluído, com o microscópio de contraste de fase, o microscópio confocal e os sistemas eletrônicos de intensificação, armazenamento e processamento de imagens.

Outro passo foi representado pela utilização sistemática de técnicas citoquímicas. Essas técnicas permitiram o conhecimento da composição química de muitos componentes celulares que antes eram estudados apenas do ponto de vista morfológico. O isolamento de organelas por centrifugação diferencial ou fracionada representou outro grande avanço, pois assim foi possível estudar, *in vitro*, tanto a composição química precisa como também as funções das organelas.

O advento do microscópio eletrônico com seu emprego para estudos morfológicos e citoquímicos representou enorme impulso para o conhecimento das funções celulares. A influência do microscópio eletrônico foi tão grande que levou a uma revisão completa nos conceitos morfológicos dos constituintes celulares. Atualmente, a forma e a estrutura das organelas são geralmente descritas conforme observadas no microscópio eletrônico.

O emprego conjunto das técnicas modernas, incluindo a radioautografia, a cultura de células em meios nutritivos definidos, o emprego do microscópio de fluorescência, do microscópio confocal, dos microscópios eletrônicos, das técnicas de criofratura e das técnicas bioquímicas, veio ampliar de tal maneira o estudo das células, que se tornou usual designar essa nova abordagem sob a rubrica de *Biologia Celular e Molecular*.

Bibliografia

Allen, R.D.: New observations on cell architecture and dynamics by videoenhanced contrast optical microscopy. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **14**:265, 1985.

Baker, J.R.L.: *Autoradiography: A Comprehensive Overview*. Oxford Univ. Press, 1989.

Bendayan, M.: Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: Methods, applications and limitations. *J. Electron Microsc. Techn.*, **1**:243, 1984.

Bozzola, J.J. and Russell, L.D.: *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett Publishers, 1992.

Cuello, A.C.C.: *Immunocytochemistry*. John Wiley, 1983.

Everhart, T.E. and Hayes, T.L.: The scanning electron microscope. *Sci. Am.*, **226**:54, (Jan.) 1972.

Freshney, R.I.: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Liss Pub., 1987.

Glauert, A.M. (ed.): *Practical Methods in Electron Microscopy*. North. Holland/American Elsevier, 1980.

Goldstein, J.I. *et al.*: *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Plenum, 1981.

Grimstone, A.V.: *O Microscópio Eletrônico em Biologia*. Editora da Univ. de S. Paulo, 1980.

Hayat, M.A. (ed.): *Correlative Microscopy in Biology. Instrumentation and Methods*. Acad. Press, 1987.

Hayat, M.A. (ed.): *Immunogold-silver Staining. Principles, Methods, and Applications*. CRC Press, 1995.

James, J.: *Light Microscopic Techniques in Biology and Medicine*. Martinus Nijhoff, 1976.

Meneghini, R. (ed.): *Biologia de Células em Cultura*. Anais do IX Simpósio da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1985.

Pearse, A.G.E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*, 4th ed. Churchill Livingstone, 1980.

Rogers, A.W.: *Techniques of Autoradiography*, 3rd ed. Elsevier, 1979.

Slayter, M.E. and Slayter, H.S.: *Light and Electron Microscopy*. Cambridge University Press, 1992.

Sanderson, J.B.: *Biological Microtechnique*. Bios Scient. Publishers, 1994.

Sommerville, J. and Scheer, U. (eds.): *Electron Microscopy in Molecular Biology. A Practical Approach*. IRL Press, 1987.

Spencer, M.: *Fundamentals of Light Microscopy*. Cambridge University Press, 1982.

Watt, I.M.: *The Principles and Practice of Electron Microscopy*, 2nd ed. Cambridge Univ. Press, 1997.

Wischnitzer, S.: *Introduction to Electron Microscopy*. Pergamon Press, 1981.

3 Bases Macromoleculares da Constituição Celular

Roteiro

- A estrutura e o funcionamento das células dependem principalmente de macromoléculas formadas pela polimerização de monômeros
- A molécula da água é um dipolo com características especiais que a tornam indispensável à vida
- As proteínas são polímeros de 20 aminoácidos diferentes
- A estrutura das moléculas das proteínas apresenta quatro níveis de organização: primário, secundário, terciário e quaternário
- O metabolismo celular deve-se à atividade das enzimas
- Pela ação do frio, pode-se baixar ou parar, temporariamente, a ação das enzimas
- Agrupadas em sequência, muitas vezes presas a membranas, as enzimas atuam de modo mais eficiente
- Isoenzimas são moléculas ligeiramente diferentes que atuam sobre o mesmo substrato; porém, com velocidades diferentes
- Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) são polímeros de nucleotídios
- Há três tipos de RNA, com funções diferentes: RNA de transferência, RNA mensageiro e RNA ribossômico
- O RNA pode apresentar ação enzimática
- A hibridização molecular permite caracterizar bem as moléculas de RNA e de DNA
- Os lipídios são componentes importantes das membranas celulares e formam reservas nutritivas
- Os polissacarídios constituem reserva energética sob a forma de glicogênio (nas células animais) e amido (nas células vegetais), e desempenham papel estrutural como parte das moléculas de glicoproteínas e proteoglicanas.

As moléculas que constituem as células são formadas pelos mesmos átomos encontrados nos seres inanimados. Todavia, na origem e evolução das células, alguns tipos de átomos foram selecionados para a constituição das biomoléculas. Noventa e nove por cento da massa das células são formados de hidrogênio, carbono, oxigênio e nitrogênio, enquanto, nos seres inanimados da crosta terrestre, os quatro elementos mais abundantes são oxigênio, silício, alumínio e sódio. Excluindo-se a água, existe nas células predominância absoluta dos compostos de carbono, extremamente raros na crosta da Terra. Portanto, a primeira célula e as que dela evoluíram selecionaram os compostos de carbono (compostos orgânicos), cujas propriedades químicas são mais adequadas à vida.

As células são constituídas de macromoléculas poliméricas

É característica da matéria viva a presença de moléculas de alto peso, ou macromoléculas, que são polímeros constituídos pela repetição de unidades menores, chamadas monômeros. Os polímeros formados por monômeros semelhantes são chamados de homopolímeros. É o caso do glicogênio, que é constituído exclusivamente por moléculas de glicose. Os heteropolímeros são constituídos por monômeros diferentes. Os ácidos nucleicos, por exemplo, são heteropolímeros.

As macromoléculas existem nas células com grande diversidade, não só quanto ao seu tamanho, mas, principalmente, quanto à variedade dos seus monômeros constituintes. Os polímeros encontrados nos seres vivos (biopolímeros) serão aqui estudados quanto à sua constituição e quanto à importância biológica dos processos de interação dessas macromoléculas. Os biopolímeros de maior importância são as proteínas, constituídas por aminoácidos; os polissacarídios, que são polímeros de monossacarídios; e os ácidos nucleicos (DNA e RNA), formados por nucleotídios.

Além dos polímeros, moléculas menores como lipídios, água, sais minerais e vitaminas têm relevante papel na constituição e no funcionamento das células.

A diversidade estrutural e funcional de um polímero depende da variedade de seus monômeros. Na constituição das proteínas participam 20 aminoácidos diferentes, enquanto os ácidos nucleicos são formados por apenas cinco tipos de nucleotídios (monômeros); por isso, as proteínas têm maior polimorfismo e, consequentemente, maior diversidade funcional do que os ácidos nucleicos.

Frequentemente, macromoléculas de diferentes tipos se associam para formar complexos como as lipoproteínas, glicoproteínas e proteoglicanas (proteínas combinadas com polissacarídios) e as nucleoproteínas (ácidos nucleicos mais proteínas).

A molécula da água é assimétrica

Conforme estudamos no Capítulo 1, as primeiras células surgiram na massa líquida que cobria a maior parte da superfície terrestre há bilhões de anos. Provavelmente ao acaso e a partir de moléculas orgânicas originadas antes da existência de qualquer ser vivo (origem pré-biótica), formaram-se micelas que evoluíram pelo aparecimento de uma membrana, originando-se, assim, as primeiras células. A origem das células está associada à água de tal modo que esta é, sem exceção, a molécula mais abundante em todas as células. As moléculas de proteínas, lipídios e polissacarídios variam de uma célula para outra, mas todas as células contêm água. Esse composto não é uma molécula inerte, com a única função de preencher espaços; ao contrário, a água e seus íons influem poderosamente na configuração e nas propriedades biológicas das macromoléculas.

A molécula de água é morfológica e eletricamente assimétrica. Os dois átomos de hidrogênio formam com o de oxigênio um ângulo que, em média, é estimado em 104,9°. Portanto, apesar de ser representada pela fórmula H–O–H, a molécula de água não é um bastão reto. Por outro lado, em razão da forte atração exercida pelo núcleo do oxigênio sobre os elétrons, a molécula de água é relativamente positiva, no lado dos dois hidrogênios, e negativa no lado do oxigênio; isto é, a molécula de água é um dipolo. No espaço, em virtude da forma das órbitas do hidrogênio e oxigênio, as cargas elétricas estão distribuídas de tal modo que o oxigênio ocupa o centro e os hidrogênios (relativamente positivos), os dois extremos de um tetraedro, conforme mostra a Figura 3.1.

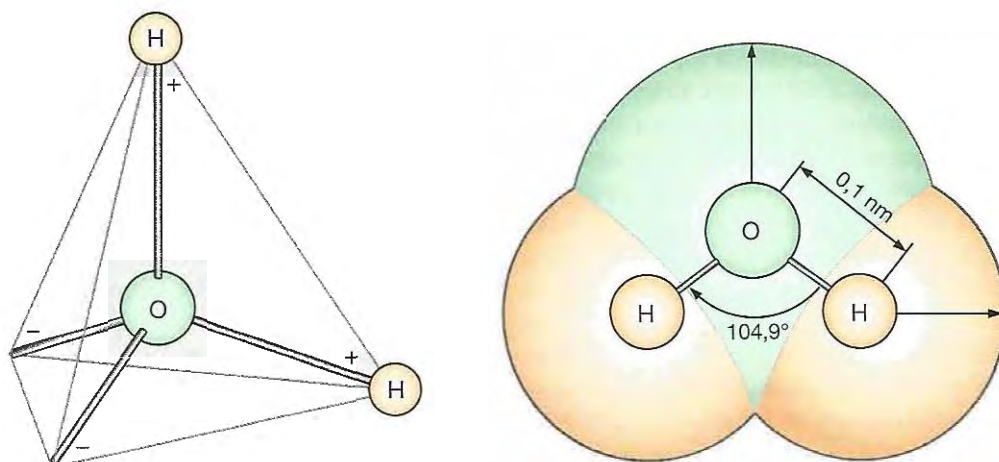



Figura 3.1 ▪ *À esquerda*, esquema do dipolo da água; *à direita*, a forma tridimensional de sua molécula.

Por sua natureza dipolar, a água é um dos melhores solventes conhecidos. Ela dissolve muitas substâncias cristalinas e outros compostos iônicos porque sua tendência a se combinar com íons negativos ou positivos é, frequentemente, maior que a tendência de os íons se combinarem entre si. Por exemplo, os cristais de NaCl dissolvem-se com facilidade em água porque, apesar da atração eletrostática entre o Cl^- e o Na^+ do cristal, cada um desses íons é atraído ainda de modo mais forte pelo dipolo da água. Assim, o cristal se rompe, formando-se os íons hidratados de Cl^- e Na^+, altamente estáveis.

Tabela 3.1 ▪ Energia despendida para romper algumas ligações moleculares de interesse biológico.

Tipo de ligação		Energia (kcal/mol)
Ligações covalentes (fortes)	$H_3C—CH_3$	88 (simples)
	C=O	170(dupla)
	N≡N	226 (tripla)
Ligações não covalentes (fracas)	Ponte de H	5
	Ligação iônica	5
	Interação hidrofóbica	1-3

O grau de afinidade pela água apresenta papel relevante nas propriedades biológicas das macromoléculas

Os polímeros celulares contêm em sua estrutura grupamentos químicos que apresentam afinidade pela água (grupamentos polares) ou que não apresentam afinidade pela água (grupamentos apolares), repelindo-a. Os grupamentos polares principais são carboxila, hidroxila, aldeído, sulfato e fosfato. Moléculas com alto teor de grupamentos polares são francamente solúveis na água e são chamadas de hidrofílicas (*hidro*, água, e *filos*, amigo). A maioria dos hidratos de carbono, os ácidos nucleicos e muitas proteínas são hidrofílicas. Em contrapartida, há moléculas sem ou com poucos grupamentos polares e que, consequentemente, são insolúveis na água; são as moléculas hidrofóbicas (*hidro*, água, e *fobos*, aversão). Como exemplos, podem ser citados os lipídios, a parafina e os óleos – essas moléculas são repelidas pela água.

Existem também macromoléculas, geralmente alongadas, que apresentam uma região hidrofílica e outra hidrofóbica; são as moléculas chamadas anfipáticas, dotadas da capacidade de associar-se simultaneamente a água e a compostos hidrofílicos, por uma de suas extremidades, e a compostos hidrofóbicos, pela outra extremidade. As moléculas anfipáticas exercem importantes funções biológicas, e estão presentes em todas as membranas celulares.

A análise das forças responsáveis pela coesão dos monômeros nos biopolímeros demonstrou que existem dois tipos gerais de forças que podem ser agrupadas de acordo com a sua intensidade. Essa intensidade, por sua vez, pode ser avaliada pela energia necessária para se realizarem ou se desfazerem essas uniões (Tabela 3.1). De um lado estão as ligações fortes, chamadas covalentes. São resultantes da superposição das órbitas externas das moléculas e são uniões fortes e estáveis que consomem altas quantidades de energia para sua realização. É o tipo de união que se observa nas ligações peptídicas entre os aminoácidos e que só podem ser desfeitas por procedimentos drásticos como a hidrólise em ácido forte a alta temperatura. Essas ligações necessitam de cerca de 100 kcal por mol para se formarem. Do outro lado, estão as ligações fracas, de natureza variada, que se formam com pequeno gasto energético e podem ser desfeitas por procedimentos suaves como aquecimento moderado e alteração da concentração iônica do meio. As principais ligações fracas são as: pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. As pontes de hidrogênio ocorrem em razão do uso em comum de um átomo de hidrogênio por radicais diferentes. No caso das proteínas, isso tem lugar entre o nitrogênio e a carbonila de ligações peptídicas diferentes (Figura 3.6). As pontes de hidrogênio são também importantes na ligação entre as duas cadeias do DNA, ligação essa que ocorre em função de pontes que se estabelecem entre duas bases (Figura 3.19). As ligações eletrostáticas são ligações que se formam quando um grupo ácido se prende a um básico; são exemplos as ligações entre aminoácidos básicos e ácidos, entre corantes ácidos (geralmente com grupos sulfônicos) e proteínas básicas dos tecidos ou entre as glicosaminoglicanas (que contêm grupamentos sulfato) e proteínas básicas. As interações hidrofóbicas ocorrem entre moléculas apolares que são comprimidas umas contra as outras pela repulsão que sofrem da água que as envolve. Não é, portanto, propriamente uma ligação, como ocorre nas pontes de hidrogênio ou ligação eletrostática, sendo mais adequadamente definida como uma interação. O exemplo mais importante de interação hidrofóbica em biologia tem lugar nas membranas da célula (Capítulo 5), onde as duas camadas de lipídios associam-se principalmente em virtude desse tipo de interação.

A importância biológica dessas interações e ligações de baixa energia reside no fato de que elas permitem à célula alterar, montar e desmontar estruturas supramoleculares, como, por exemplo, os microtúbulos e microfilamentos, aumentando, assim, sobremaneira a sua versatilidade e eficiência funcional, sem grande gasto energético. Se as interações das macromoléculas fossem realizadas apenas com ligações fortes, a estrutura celular seria estável, e as modificações dessa estrutura implicariam um gasto de energia tão alto que a atividade celular seria impossível.

Proteínas são polímeros de aminoácidos

As proteínas são macromoléculas que contêm um número variável de L-aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (Figuras 3.2 e 3.3); são, portanto, polímeros de aminoácidos. As cadeias assim constituídas chamam-se cadeias polipeptídicas e, ao atingirem determinada dimensão, recebem o nome de proteína. É comum considerar proteínas os polipeptídios com peso molecular a partir de 6.000 dáltons (6 kDa).

Embora existam mais de 150 aminoácidos, só 20 são encontrados nas proteínas (Figura 3.4). Esses 20 aminoácidos celulares são todos de estrutura L, o que reforça a hipótese, apresentada

no Capítulo 1, segundo a qual todas as células hoje existentes derivam de uma célula ancestral única. A célula ancestral teria aproveitado os L-aminoácidos, sendo a capacidade de utilizá-los transmitida a todas as células descendentes.

Os aminoácidos encontrados nas proteínas têm em comum a presença de um grupo NH_2 (amino) e um grupo COOH (carboxila) ligados ao carbono alfa da molécula (Figuras 3.2 e 3.3). São exceção a prolina e a hidroxiprolina, que contêm o grupo NH (imino) em substituição ao grupo NH_2. Na realidade, a prolina e a hidroxiprolina são iminoácidos (Figura 3.4), mas se incluem entre os aminoácidos por apresentarem propriedades semelhantes.

$$R-C_{\alpha}H(NH_2)-COOH$$

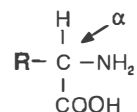



Figura 3.2 ▪ Fórmula geral dos alfa-aminoácidos.

$$H_3C-CH(NH_2)-COOH + H-NH-CH(CH_2OH)-COOH \longrightarrow H_3C-CH(NH_2)-CO-NH-CH(CH_2OH)-COOH + H_2O$$

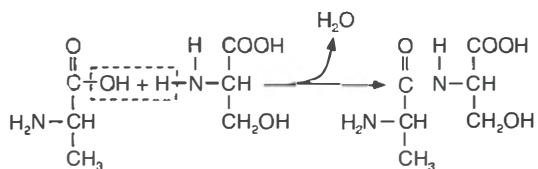
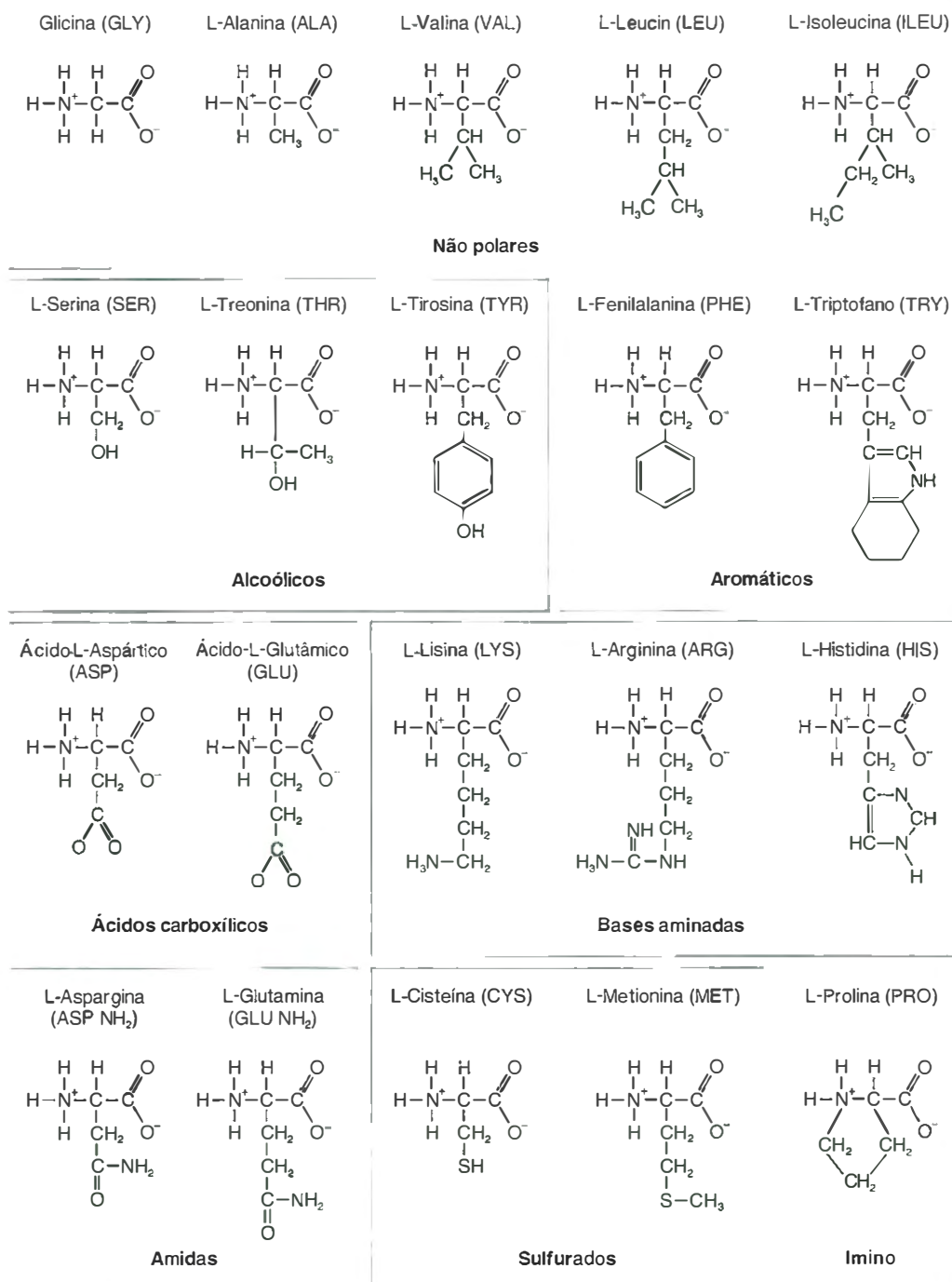



Figura 3.3 ▪ Formação da ligação peptídica, indicada em sombreado, pela união de dois aminoácidos e formação de uma molécula de água.

3.4 ▪ Moléculas dos 20 aminoácidos encontrados nas proteínas. As cadeias laterais, responsáveis por certas propriedades químicas dos aminoácidos, estão indi- [illegible] sombreado.

As proteínas podem ser classificadas em duas categorias: as proteínas simples, cujas moléculas são formadas exclusivamente por aminoácidos, e as proteínas conjugadas, que se caracterizam pela presença, em suas moléculas, de uma parte não proteica denominada grupo prostético. Entre as proteínas conjugadas podem ser mencionados os seguintes exemplos: nucleoproteínas, com grupo prostético constituído por ácidos nucleicos; glicoproteínas, que contêm polissacarídios; lipoproteínas, que contêm lipídios; fosfoproteínas, cujo grupo prostético contém fósforo; hemeproteínas (catalases, peroxidases e citocromos) contendo o grupo heme, que é uma ferroporfirina; flavoproteínas contendo riboflavina no grupo prostético; e, finalmente, metaloproteínas, nas quais o grupo prostético é um metal (insulina e anidrase carbônica, que contêm zinco) ou um composto inorgânico que contém metal, como, por exemplo, a ferritina, cujo grupo prostético é o $Fe(OH)_3$.

Os grupamentos NH_2 e COOH são ionizáveis, o que confere carga elétrica às proteínas e condiciona a sua migração em um campo elétrico. Conforme haja predominância de grupos NH_2 ou COOH, as proteínas são básicas ou ácidas, respectivamente; por exemplo, as histonas, ricas em lisina e arginina (aminoácidos com dois grupos NH_2 por molécula), são eletricamente positivas em pH 7, portanto, básicas e, por isso, combinam-se com os grupos fosfato do ácido desoxirribonucleico (DNA) para formar nucleoproteínas.

Figura 3.5 ▪ *Em cima, à esquerda,* aparece uma molécula proteica globosa, em sua configuração nativa (forma da molécula nas condições naturais dentro da célula). *No centro,* a mesma molécula, porém, desnaturada. Como a desnaturação é frequentemente reversível, a molécula pode voltar à sua forma inicial, como mostra a figura *embaixo, à direita.* As pequenas faixas pretas representam os radicais que se unem para estabelecer a configuração nativa da proteína.

A sequência de aminoácidos influi na forma tridimensional e no papel biológico das moléculas proteicas

A forma tridimensional da molécula de uma proteína está relacionada com a sequência de aminoácidos e com o número de cadeias polipeptídicas que constituem sua molécula. Há proteínas cuja molécula tem apenas uma cadeia polipeptídica, enquanto outras apresentam múltiplas cadeias, em geral umas diferentes das outras. Por exemplo, a hemoglobina é constituída por duas cadeias alfa (iguais entre si) e duas cadeias beta (também iguais entre si).

Do ponto de vista biológico, o conhecimento da forma tridimensional das moléculas proteicas em estado nativo (configuração nativa) é muito importante, pois é assim que, dentro da célula, as moléculas mostram atividade e interagem umas com as outras. Chama-se configuração nativa a forma tridimensional que uma molécula apresenta nas condições de pH e temperatura existentes nos organismos vivos (Figura 3.5).

A estrutura das moléculas proteicas é mantida pelas seguintes forças de estabilização:

- ligação peptídica: resultante de ligação covalente
- interação hidrofóbica
- pontes de hidrogênio
- ligações dissulfeto ou S–S: ligações covalentes entre moléculas do aminoácido cisteína.

O número e a sequência dos resíduos aminoácidos em uma cadeia polipeptídica determinam a estrutura primária da proteína. A estrutura primária é mantida por ligações peptídicas, mas, se estas fossem as únicas ligações existentes, as moléculas das proteínas seriam dobradas ao acaso, irregularmente.

Entretanto, o estudo das propriedades das moléculas proteicas em estado nativo revela que elas são constituídas por cadeias polipeptídicas dobradas de maneira bastante regular e constante para cada tipo de proteína.

As cadeias se dobram e se enrolam de modo complexo, para constituírem um arranjo espacial definido e típico da proteína conhecido como sua estrutura secundária. Uma estrutura secundária muito frequente entre as proteínas globulares que formam a maioria das proteínas da célula é a alfa-hélice (Figura 3.6). Essa configuração se deve à formação de pontes de hidrogênio entre aminoácidos de uma mesma cadeia, a qual adquire a forma de saca-rolha ou hélice.

A cadeia que contém a estrutura secundária dobra-se novamente sobre si mesma, formando estruturas globosas ou alongadas, adquirindo, assim, uma estrutura terciária (Figura 3.7).

Muitas proteínas têm moléculas constituídas por várias cadeias peptídicas, que podem ser iguais ou diferentes. Essas cadeias chamam-se subunidades ou monômeros. O modo específico de as subunidades se juntarem para formar a molécula proteica tem o nome de estrutura quaternária da proteína (Figura 3.8). Essa estrutura é mantida graças à cooperação de numerosas ligações químicas fracas, como as pontes de hidrogênio. Por meio da organização proteica quaternária, formam-se diversas estruturas de grande importância biológica, como os microtúbulos, microfilamentos, capsômeros dos vírus e os complexos enzimáticos que serão descritos adiante, neste capítulo. Também as fibrilas colágenas (Figura 3.9)

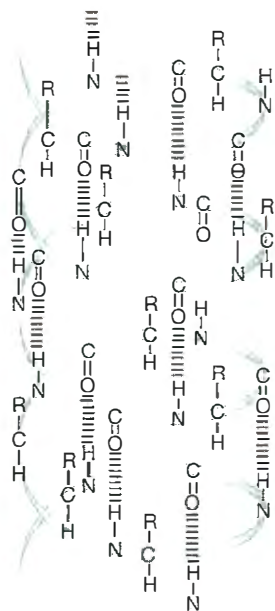



Figura 3.6 • Estrutura secundária (alfa hélice) de uma proteína. As pontes de hidrogênio entre os aminoácidos estão representadas por traços paralelos.

encontradas no espaço extracelular do tecido conjuntivo são constituídas pela agregação de cadeias polipeptídicas de tropocolágeno.

Diz-se que uma proteína é globular quando a sua molécula tem uma relação comprimento-largura menor do que 10:1. A grande maioria das proteínas das células é globular, como a hemoglobina, a mioglobina, a hemocianina, as proteínas com atividade enzimática e as proteínas das membranas celulares. Quando a relação comprimento-largura é maior que 10:1, a proteína é dita fibrosa.

Dentre as proteínas fibrosas intracelulares, a queratina é a mais bem estudada (Figura 3.10). A proteína mais abundante no corpo dos mamíferos é o colágeno, proteína fibrosa extracelular que constitui as fibrilas colágenas já mencionadas.

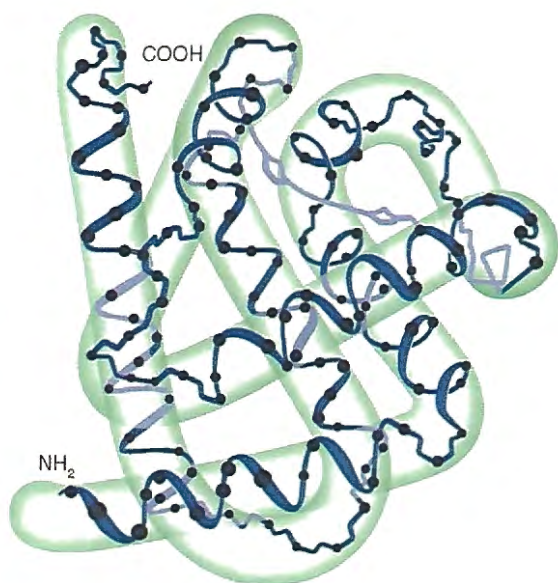



Figura 3.7 • Esquema das estruturas primária, secundária e terciária de uma proteína. Na fita negra estão representados os resíduos aminoácidos (estrutura primária) e a hélice formada por eles (estrutura secundária). As dobras da molécula, demonstradas por seu contorno externo, em pontilhado fino, constituem a estrutura terciária.

■ Moléculas chaperonas auxiliam na formação das complexas moléculas proteicas e na destruição das proteínas defeituosas

Nos diversos locais do ambiente intracelular, muitas proteínas estão se formando simultaneamente, o que dificulta a estruturação dos complexos proteicos. Essa dificuldade, provocada pelo aglomerado de moléculas nascentes no ambiente intracelular, é contornada pelas moléculas chaperonas, que são proteínas cuja função principal é se unirem às cadeias polipeptídicas nascentes, até que elas se liguem a outras cadeias polipeptídicas, para formar corretamente as complexas moléculas finais. Sem o trabalho das chaperonas, formar-se-iam muitos agregados proteicos sem atividade funcional, pela união, ao acaso, das numerosas cadeias polipeptídicas que são continuamente sintetizadas na célula.

As moléculas chaperonas não só minimizam a agregação errada das cadeias polipeptídicas, como desfazem as agregações defeituosas e promovem a eliminação, por hidrólise, das moléculas proteicas incorretamente formadas. Muitas tarefas das moléculas chaperonas são realizadas com gasto de energia fornecida por ATP.

As chaperonas desempenham ainda outras funções, como impedir o enovelamento das moléculas proteicas sintetizadas no citosol, porém, destinadas às mitocôndrias. Os mecanismos de transferência de proteínas para dentro das mitocôndrias só funcionam para transportar moléculas distendidas, e nunca moléculas já dobradas em sua configuração final. Depois da penetração da proteína mitocondrial distendida pela chaperona respectiva, as duas se separam, e a proteína mitocondrial assume sua forma retorcida final, ativa. Em outros locais, as chaperonas desempenham ainda outras funções. Nas cisternas do retículo endoplasmático existe uma chaperona que auxilia a orientação do dobramento de moléculas proteicas para que elas assumam a conformação tridimensional correta.

As principais chaperonas são denominadas hsp60 e hsp70. A abreviatura provém de *heat shock protein*, porque elas aumentam de quantidade quando as células são levadas a temperaturas mais elevadas, e o número indica o peso molecular expresso em quilodáltons (kDa).

■ Os genes controlam o metabolismo celular por meio das enzimas

As enzimas são moléculas proteicas dotadas da propriedade de acelerar intensamente determinadas reações químicas, tanto no sentido da síntese como no da degradação de moléculas. São elas as principais responsáveis pela eficiência da maquinaria química intracelular. Graças às enzimas, as células executam, em milésimos de segundo, a síntese de moléculas que, *in vitro*, sem enzimas, necessitariam de semanas de trabalho para serem sintetizadas. Além da rapidez, as sínteses enzimáticas apresentam alto rendimento, isto é, no final da reação gera-se apenas o produto desejado ou alguns produtos, mas todos úteis às células. Ao contrário, nas sínteses de laboratório, não enzimáticas, formam-se, além das moléculas

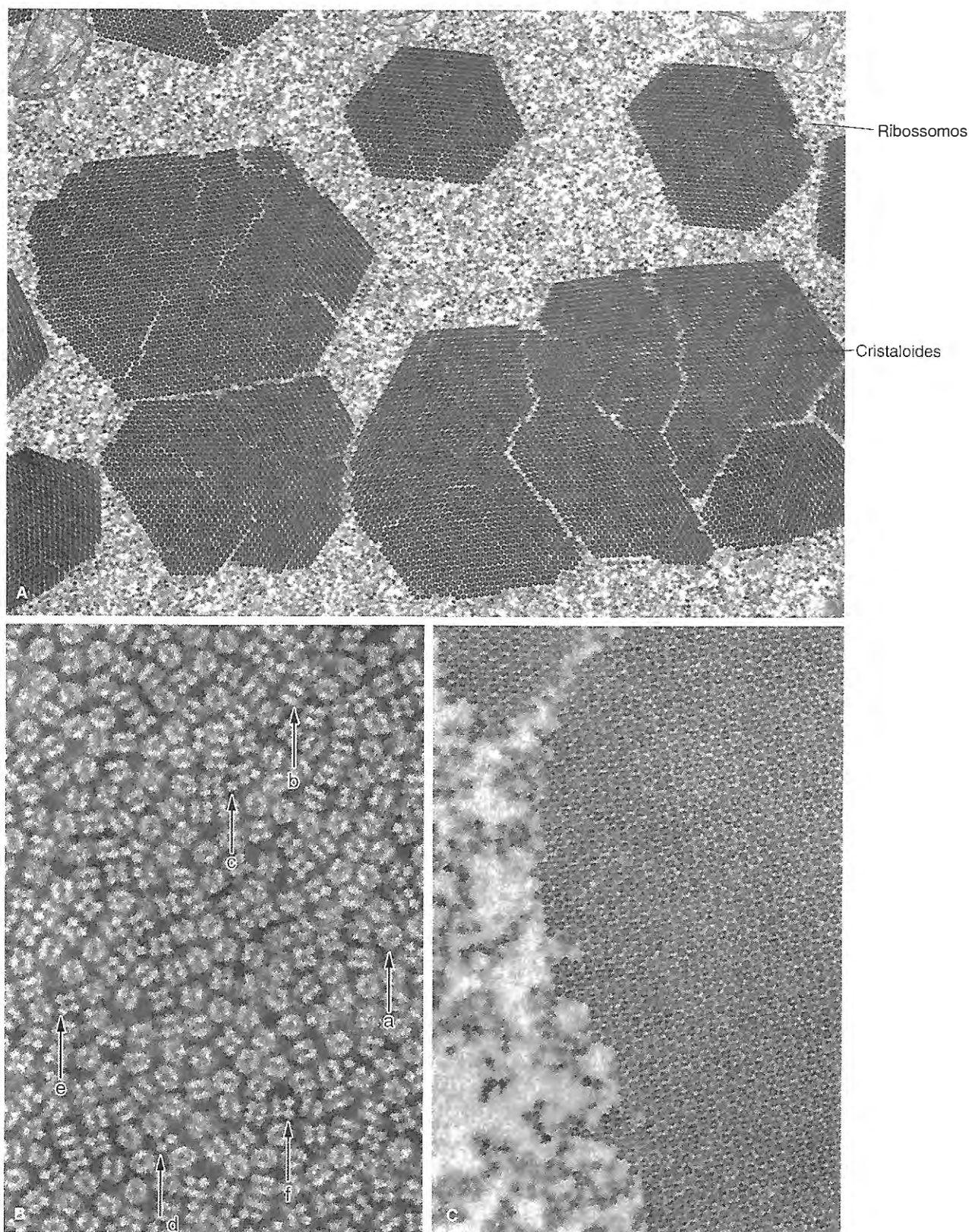



Figura 3.8 ▪ Estas eletromicrografias mostram um exemplo da estrutura quaternária de uma proteína, a hemocianina, presente no sangue de *Limulus polyphenus*. **A.** Corte da célula produtora de hemocianina, cujas moléculas se agrupam formando cristaloides (43.000×). **B.** Com maior aumento (80.000×), as moléculas componentes dos cristaloides (hemocianina) são visíveis. **C.** Com aumento ainda maior (210.000×), observa-se claramente que a molécula de hemocianina é um tetrâmero que aparece com aspectos diferentes conforme a posição em que é observado (*a* e *b*). Sua subunidade ou monômero está indicada em *c*. Observar ainda dímeros (*d*) e os tetrâmeros com seus quatro monômeros globulares bem visíveis (*e* e *f*). (Micrografias de W.H. Fahrenbach, *Journal of Cell Biology*, *44*:445, 1970. Reprodução autorizada.)

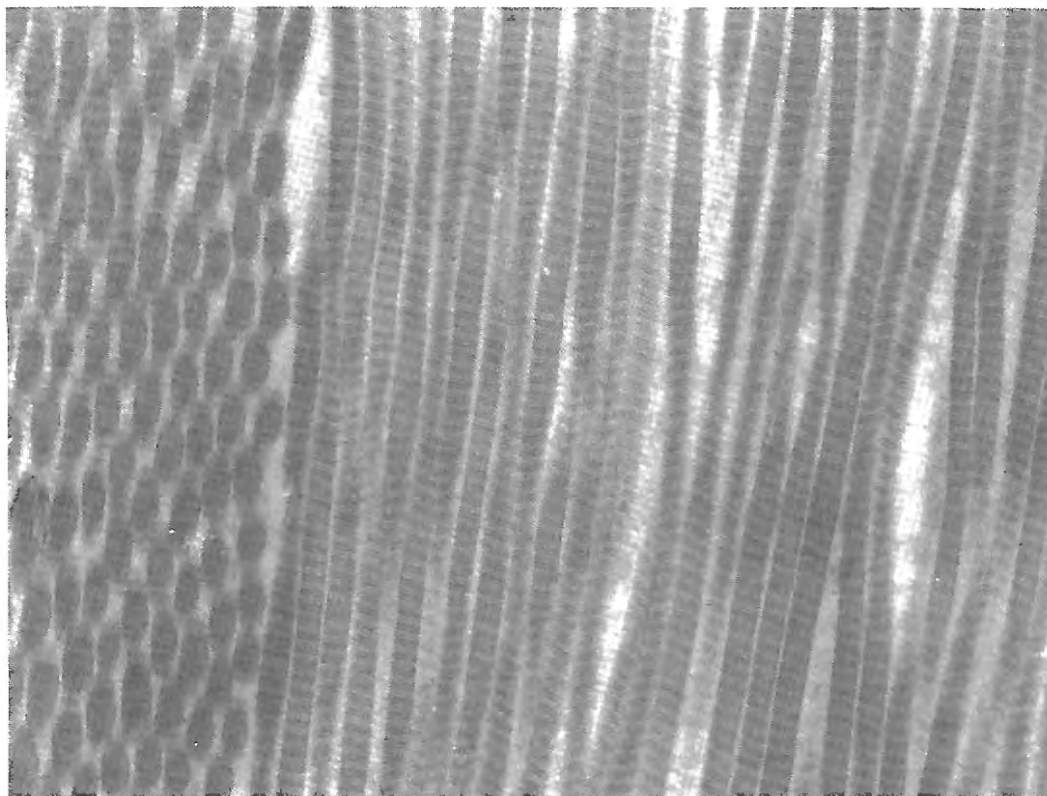



Figura 3.9 ▪ Eletromicrografia do tecido conjuntivo da pele humana. As estruturas alongadas são fibrilas colágenas constituídas pela agregação de moléculas de tropocolágeno (proteína fibrosa). As fibrilas são estruturas proteicas quaternárias cujo monômero é o tropocolágeno. *À esquerda*, cortes oblíquos dessas fibrilas. Aumento: 33.000×.

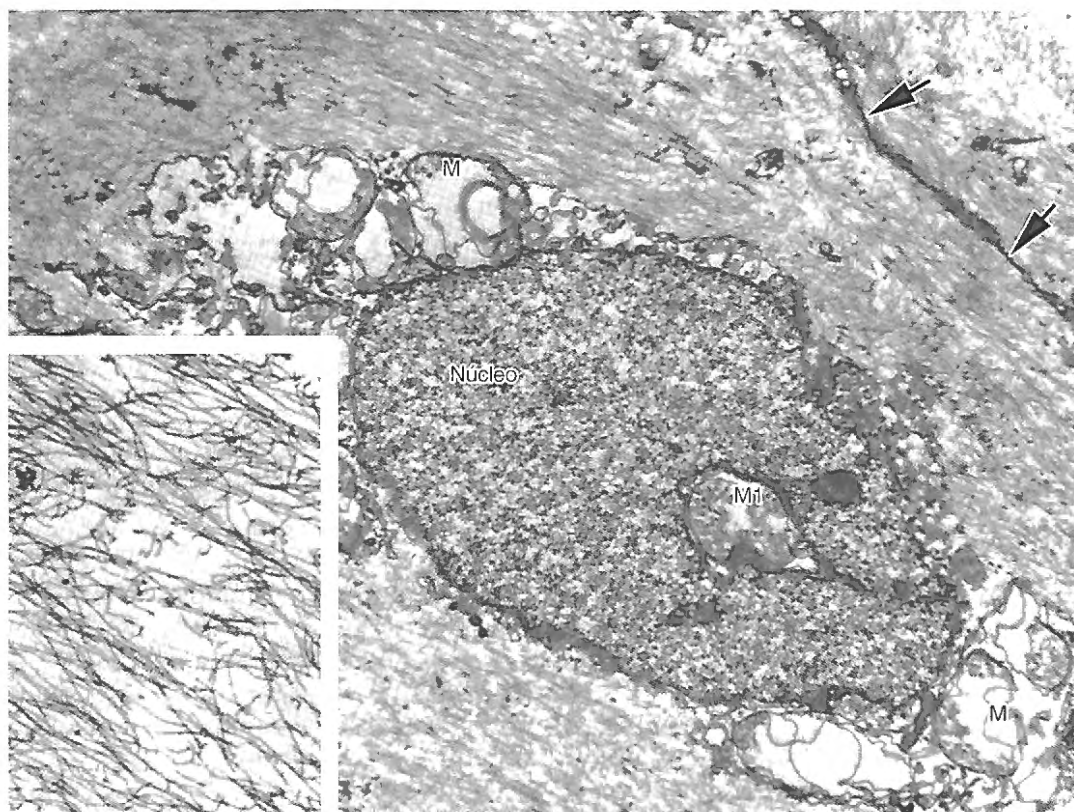



Figura 3.10 ▪ Eletromicrografia de célula epidérmica de peixe. As *setas* indicam o limite entre duas células. Observe os numerosos filamentos de queratina (proteína fibrosa); *M*, mitocôndria; *M1*, mitocôndria em dobra (invaginação) do envoltório nuclear. Aumento: 10.000×. A micrografia menor, *à esquerda*, mostra os filamentos de queratina aumentados 200.000×.

desejadas, numerosos subprodutos, originando-se assim uma mistura da qual a molécula desejada deve ser separada. Se isso acontecesse no meio intracelular, haveria uma concentração de produtos indesejáveis que perturbaria o metabolismo.

Sendo catalisadores tão eficientes, as enzimas têm sido usadas para síntese *in vitro*, tanto no laboratório experimental como na produção industrial.

As enzimas são proteínas e, como tais, produzidas sob o controle do DNA. Elas são os efetores da informação genética contida no DNA, e é por meio delas que o DNA comanda todo o metabolismo celular. Embora praticamente todas as moléculas enzimáticas sejam proteínas, há alguns RNA, denominados ribozimas, que apresentam atividade enzimática, constituindo uma exceção à regra geral.

Ação enzimática. O composto que sofre a ação de uma enzima chama-se substrato. A molécula da enzima contém um ou mais centros ativos, aos quais o substrato se combina para que seja exercida a ação enzimática. A forma tridimensional da enzima é importante para a sua atividade, pois os centros ativos são regiões cuja conformação tridimensional é complementar da molécula do substrato. Essa estereocomplementaridade é essencial para que se verifique o encaixe tridimensional preciso entre a enzima e seus substratos (Figura 3.11); é por meio desse encaixe que a enzima reconhece e se prende com maior ou menor intensidade (afinidade) a seus substratos.

A especificidade das enzimas é muito variável. Algumas atuam exclusivamente sobre um tipo de molécula, não atacando sequer seu estereoisômero. Por exemplo, a desidrogenase láctica é específica para o L-lactato, e a D-aminoácido-oxidase só ataca os D-aminoácidos. Por outro lado, há enzimas que atuam sobre vários compostos com alguma característica estrutural comum. É o caso, por exemplo, das fosfatases, que hidrolisam diversos ésteres do ácido fosfórico.

Para exercerem sua atividade, muitas enzimas necessitam de cofatores, que podem ser um íon metálico ou uma molécula. Quando o cofator é uma molécula, recebe o nome de coenzima. Ao contrário da própria enzima, que, sendo proteína, é desnaturada e inativada por temperaturas muito elevadas, em geral as coenzimas são termoestáveis.

Alguns cofatores estão ligados de modo permanente e íntimo à molécula da enzima, enquanto outros a ela se unem temporariamente, durante a ação enzimática. O complexo formado pela enzima com o cofator, independentemente do grau de união química entre eles, chama-se holoenzima. Removendo-se o cofator, resta a parte proteica da enzima, que é então inativa e se chama apoenzima.

Quando o cofator está fortemente ligado à molécula da apoenzima, ele constitui um grupo prostético e a enzima deve ser considerada uma proteína conjugada.

A parte ativa de muitas coenzimas contém vitaminas do grupo B, como riboflavina, tiamina, ácido pantotênico e nicotinamida.

Nomenclatura. Muitas enzimas são designadas pelo nome do substrato sobre o qual atuam mais o sufixo -ase; por exemplo, o ácido ribonucleico (substrato) é hidrolisado por uma enzima que recebeu o nome de ribonuclease. Contudo, outras enzimas – inclusive algumas dentre as mais bem-estudadas – são conhecidas por nomes que não seguem essa regra; são exemplos a pepsina e a tripsina, que hidrolisam proteínas.

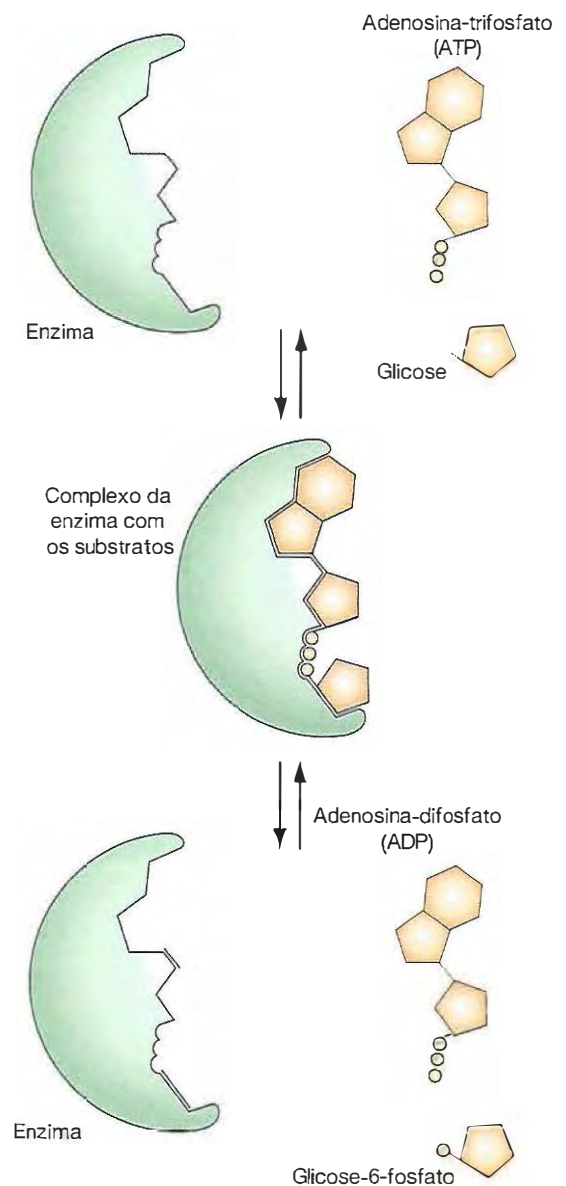



Figura 3.11 ▪ Combinação reversível entre os substratos e o centro ativo da enzima. Demonstra-se também a ação enzimática (ATP + glicose --> ADP + glicose-6-fosfato). Esta figura ilustra a importância da estrutura tridimensional de uma proteína (enzima) para sua atividade biológica. É necessário que o substrato se encaixe na molécula enzimática para que a enzima atue.

A Comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica adotou uma classificação das enzimas em seis categorias principais (Tabela 3.2), cada uma com subdivisões, e estabeleceu normas para a designação mais precisa e informativa de cada enzima. Por exemplo, pela nomenclatura da Comissão, a enzima em geral chamada hexoquinase e que catalisa a reação ATP + glicose → glicose-6-fosfato + ADP deve ser chamada ATP: hexose-fosfotransferase. Esta última denominação indica mais precisamente a ação da enzima, que é transferir um grupo fosfato do ATP para uma hexose (Figura 3.11). Todavia, a nomenclatura internacional é pouco usada na prática, porque as enzimas recebem designações muito longas, em comparação com seus nomes corriqueiros.

Tabela 3.2 ▪ Principais classes de enzimas segundo a Nomenclatura da Comissão de Enzimas, União Internacional de Bioquímica. Na classificação completa, cada classe deste quadro é subdividida.

Classe	Nome	Catalisam	Exemplos
1	Oxidorredutases	Reações nas quais um composto é reduzido e outro oxidado	Desidrogenases, oxidases, peroxidases
2	Transferases	Transferência de grupamentos químicos de uma molécula para outra	Transaminases, transmetilases
3	Hidrolases	Rompimento de moléculas com adição de água	Peptidases, fosfatases, esterases
4	Liases	Remoção de um grupo químico, originando uma dupla ligação no substrato; ou adição de um grupo a uma dupla ligação, que é assim desfeita	Descarboxilases, desaminases
5	Isomerases	Rearranjos intramoleculares que modificam a estrutura tridimensional do substrato	Racemases, epimerases
6	Ligases	União de duas moléculas, com hidrólise de ATP ou outro composto rico em energia	Acetilcoenzima A sintetase, carboxilase do piruvato

A atividade enzimática é muito sensível à ação de diversos fatores

A atividade das enzimas, muito sensível a diversos agentes químicos e físicos, é capaz de ser inibida de várias maneiras. A inibição pode ser competitiva ou não competitiva.

Entre os fatores que afetam a atividade enzimática, chamam a atenção: temperatura, concentração do substrato e presença de ativadores ou inibidores que alteram a velocidade de atuação das enzimas.

O efeito da temperatura tem grande importância prática, uma vez que o frio deprime a atividade enzimática, retardando os processos de lise celular e a deterioração de amostras de tecidos, sangue, urina etc. utilizadas em exames de laboratório. No transplante de órgãos, é comum o uso de temperaturas baixas para melhor preservação dos tecidos a serem transplantados.

Temperaturas muito baixas obtidas, geralmente, pelo uso de nitrogênio líquido (ponto de ebulição −195,8°C) são utilizadas de rotina na preservação de culturas de tecidos, amostras de tecidos para posterior análise bioquímica, sementes de plantas, espermatozoides para inseminação artificial e embriões para transplante.

▸ **Inibição competitiva.** Quando uma substância resistente à ação enzimática, porém de molécula muito parecida com a do substrato da enzima, se fixa nos centros ativos da molécula enzimática, diz-se que a inibição é competitiva. Nesse caso, o inibidor compete com o substrato para se localizar no centro ativo, e o grau de inibição é influenciado pela concentração do substrato. Quanto maior a concentração do substrato, menor a probabilidade de o inibidor chocar-se com as moléculas da enzima e ocupar seus centros ativos.

▸ **Inibição não competitiva.** Esse tipo de inibição não é afetado pela concentração do substrato, dependendo exclusivamente da concentração do inibidor. O caso mais frequente de inibição não competitiva é representado pela combinação reversível de metais pesados com os grupos —SH da molécula enzimática. Isso altera a forma tridimensional da molécula da enzima e impede sua atividade. Ocorre também inibição não competitiva quando a enzima precisa de certos íons e estes são removidos da solução; por exemplo, as enzimas que necessitam de Mg^{2+} são inibidas pelo EDTA (etilenodiaminotetracetato de sódio), pois esse composto forma um complexo com cátions divalentes e, desse modo, remove o Mg^{2+} da solução. A inibição é reversível pela adição de cátions Mg^{2+}.

Para aumentar sua eficiência, as enzimas se agrupam em complexos ou se prendem a membranas

Na célula viva, a maioria das enzimas funciona em sequência, de modo que o produto resultante da ação de uma enzima é o substrato para a enzima seguinte. Esse conjunto de enzimas que trabalham em cooperação é denominado cadeia enzimática.

Um sistema muito eficiente e frequente nas células é o representado pelos complexos de moléculas enzimáticas. Nele, todas as enzimas da cadeia se associam para formar um conjunto de moléculas que se mantêm unidas por forças químicas fracas (estrutura proteica quaternária). Na célula da levedura, por exemplo, as enzimas que sintetizam ácidos graxos a partir de pequenas moléculas formam uma cadeia que consiste em sete enzimas que se associam para formar um complexo multienzimático. As reações processam-se em sequência e as moléculas intermediárias mantêm-se presas ao complexo até a formação da molécula do ácido graxo. Isso torna o sistema mais rápido, uma vez que os substratos não precisam deslocar-se muito de uma enzima para outra.

Outro complexo enzimático bem estudado é o da desidrogenase do piruvato. No microscópio eletrônico, o complexo enzimático da desidrogenase do piruvato mostra aspecto poliédrico, e foi sugerido um modelo segundo o qual suas enzimas devem estar organizadas (Figura 3.12).

As cadeias enzimáticas mais bem organizadas e, portanto, mais eficientes são as que estão ligadas a membranas, como, por exemplo, a cadeia das enzimas respiratórias (transportadoras de elétrons) que estão presas à membrana interna das mitocôndrias. Nesses casos, não há separação entre molécula enzimática e molécula estrutural, pois as diferentes proteínas são, ao mesmo tempo, parte da membrana e também dotadas de atividade enzimática.

Cadeias enzimáticas funcionam sob regulação

A maioria das enzimas não apresenta constância em suas atividades, podendo facilmente ser modulada. Isso representa uma importante propriedade biológica porque possibilita às células modificar seletivamente a atividade de determinadas

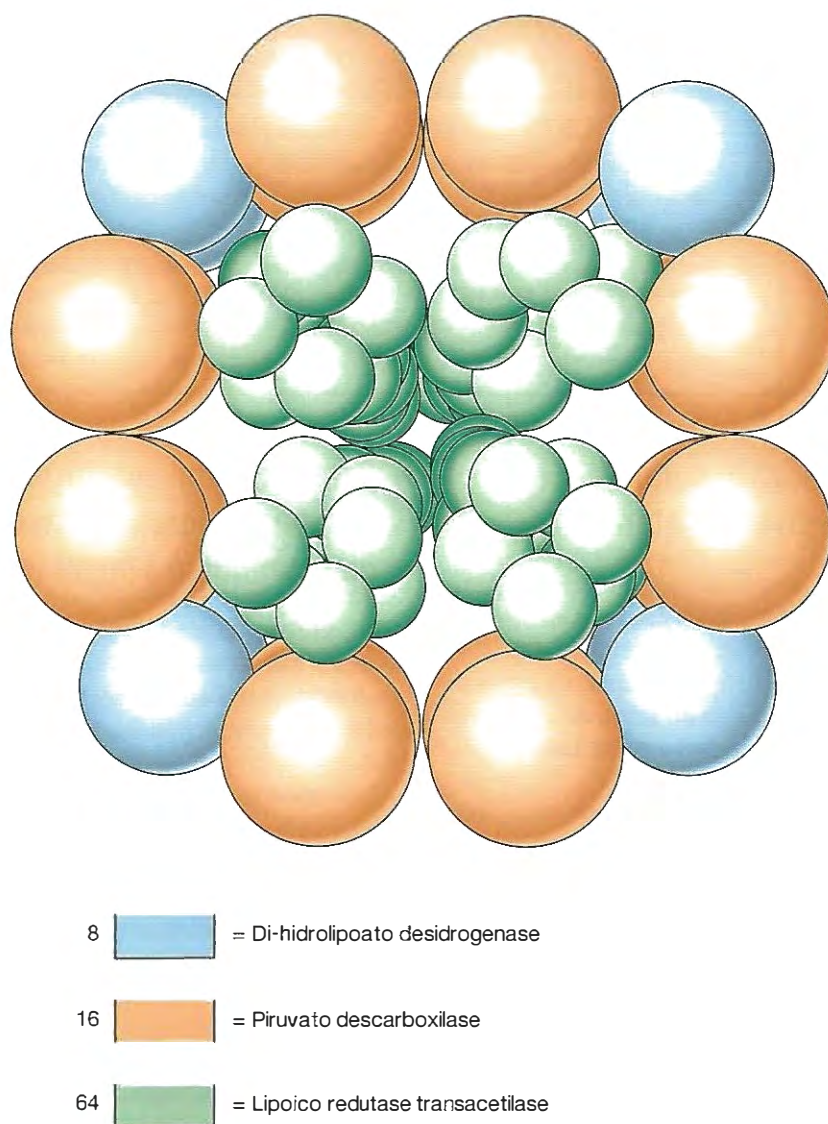



Figura 3.12 ▪ Modelo do complexo enzimático da desidrogenase do piruvato. Cada esfera colorida representa uma molécula enzimática.

enzimas, para adequá-las às necessidades momentâneas que surgem durante a vida da célula.

Muitas cadeias enzimáticas são moduladas por autorregulação, sobretudo pelo efeito do produto final da cadeia sobre a primeira enzima da sequência. Por exemplo, a L-treonina é transformada em L-isoleucina por meio de uma cadeia de cinco enzimas (Figura 3.13). A primeira enzima dessa cadeia (E1) é a L-treonina-desaminase, cuja atividade é diminuída ou suprimida pela L-isoleucina. Desse modo, a falta de L-isoleucina provoca o funcionamento da cadeia em toda a sua intensidade, enquanto o excesso de L-isoleucina faz a cadeia diminuir de ritmo, ou mesmo parar a produção de mais L-isoleucina. Assim sendo, a concentração desse aminoácido na célula permanece dentro dos limites normais. No caso, trata-se de uma regulação alostérica. A enzima sensível a esse tipo de controle – no exemplo citado, a L-treonina-desaminase – chama-se enzima reguladora, e a substância inibidora – no caso a L-isoleucina – é conhecida como efetor ou modulador.

Na regulação alostérica, que é um tipo muito frequente de regulação enzimática, o efetor combina-se com a enzima em um local diferente do centro ativo e denominado centro alostérico. Em consequência, ocorre uma modificação na conformação tridimensional da molécula enzimática, com alteração do centro ativo da enzima, cuja atividade catalítica é inibida (Figura 3.14).

Outras vezes, a atividade da enzima é modulada pela interação com outras proteínas ou então pela adição covalente de radicais fosfato aos aminoácidos serina, treonina ou tirosina presentes na molécula enzimática. A fosforilação de proteínas desempenha importante papel regulador não apenas em reações metabólicas, mas também em muitos outros processos celulares como crescimento, diferenciação celular, desmontagem do envoltório nuclear na prófase e sua reorganização na telófase.

▪ Isoenzimas são moléculas ligeiramente diferentes da mesma enzima

Determinadas enzimas existem sob formas moleculares ligeiramente distintas nos diversos tecidos, ou na mesma célula de determinada espécie animal. Nesses casos, a molé-

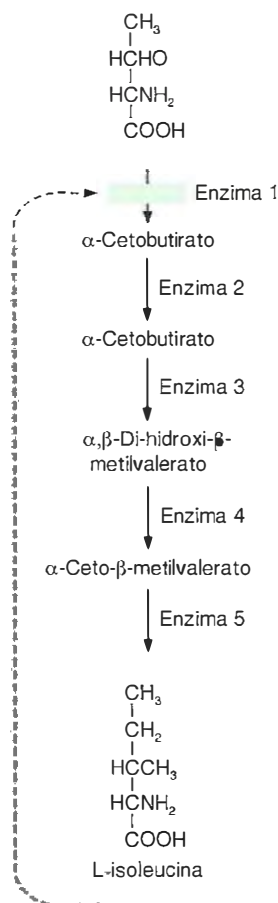



Figura 3.13 ▪ Regulação (inibição) alostérica. A L-treonina é transformada em L-isoleucina por meio de uma cadeia de cinco enzimas. Mas a primeira enzima dessa cadeia é uma proteína alostérica que é inibida pela L-isoleucina. Assim, o excesso de L-isoleucina bloqueia a síntese desse aminoácido e sua falta o estimula.

Figura 3.14 ▪ Esquema didático de regulação alostérica. A fixação do modulador no centro alostérico da proteína (enzima) modifica o centro ativo, impede a fixação do substrato e inibe a ação enzimática.

cula da enzima é constituída por cadeias polipeptídicas (monômeros) diferentes, agrupadas em proporções variáveis. As diferenças de atividade entre as enzimas são consequência das diversas proporções dos monômeros em suas moléculas. As enzimas de uma mesma espécie animal que atuam sobre o mesmo substrato, mas que exibem diferenças na atividade, no pH ótimo de ação, na mobilidade eletroforética ou em outras características, são chamadas isoenzimas. As diferenças de atividade das isoenzimas são utilizadas pelas células para modular os efeitos dessas enzimas, de acordo com suas necessidades.

Um exemplo bem estudado é a isoenzima desidrogenase do ácido láctico. Sua molécula é constituída por quatro cadeias polipeptídicas (monômeros), de dois tipos diferentes, chamados M e H. Conforme a proporção desses dois monômeros, existem cinco desidrogenases do ácido láctico, cujas moléculas podem ser assim representadas:

- 1º: 4 cadeias M (M_4H_0)
- 2º: 3 cadeias M + 1 cadeia H (M_3H_1)
- 3º: 2 cadeias M + 2 cadeias H (M_2H_2)
- 4º: 1 cadeia M + 3 cadeias H (M_1H_3)
- 5º: 4 cadeias H (M_0H_4)

Essas cinco desidrogenases lácticas foram isoladas em forma pura. Todas atacam o mesmo substrato (ácido láctico); porém, o fazem em velocidades diferentes. Portanto, do ponto de vista biológico, a principal distinção entre as isoenzimas é o grau de atividade de cada uma.

Está demonstrado que existe um gene que determina a sequência de aminoácidos do monômero M e outro que determina a do monômero H. Conforme a maior ou menor atividade de cada um desses genes, há maior produção do mRNA para M ou para H e os polirribossomos produzem diferentes quantidades de M e H. Como esses monômeros se unem espontaneamente, ao acaso, para constituir as enzimas, as proporções de M e de H dependem da atividade daqueles genes. Trata-se de um controle gênico, pelo qual, alterando as proporções dos monômeros produzidos (cadeias polipeptídicas), os genes influem na estrutura quaternária das proteínas e podem modular a sua atividade enzimática.

A desidrogenade do ácido láctico é muito importante para a produção de energia nas células anaeróbias, como algumas bactérias. Em mamíferos, que são seres aeróbios. Elas entram em ação quando há queda no fornecimento de oxigênio pela circulação sanguínea (hipoxia); isso pode acontecer, por exemplo, no músculo estriado esquelético, quando se executa atividade muscular muito intensa. Quando as fibras musculares necessitam de mais oxigênio do que a circulação sanguínea pode fornecer, elas entram em hipoxia. O piruvato é total ou parcialmente reduzido a lactato, em vez de ser oxidado completamente, como acontece quando não existe hipoxia.

Os vinte aminoácidos possibilitam a construção da enorme variedade de moléculas proteicas, com funções diversificadas

As proteínas são os componentes químicos mais diversificados da célula, em virtude de serem constituídas de 20 aminoácidos diferentes. Essa diversificação estrutural se reflete nas suas múltiplas funções biológicas (Tabela 3.4), pois, dos componentes macromoleculares das células, são os mais polifuncionais.

Além da atividade enzimática, as proteínas têm importante função estrutural (nos filamentos intermediários, microfilamentos e microtúbulos), informacional (nos hormônios proteicos) no movimento das células (exemplificado pela atividade motora do complexo actina-miosina) e, finalmente, uma pequena importância como fonte energética. A quase totalidade da energia consumida pelas células é fornecida pelas moléculas de lipídios e hidratos de carbono.

Ácidos nucleicos são polímeros de nucleotídios

Os ácidos nucleicos são constituídos pela polimerização de unidades chamadas nucleotídios.

Cada nucleotídio contém resíduos de uma molécula de ácido fosfórico, uma de pentose e uma de base púrica ou pirimídica (Figura 3.15).

As bases púricas mais encontradas nos ácidos nucleicos são a adenina e a guanina (Figuras 3.15 e 3.16), em geral designadas pelas iniciais A e G, respectivamente. As principais bases pirimídicas são a timina, a citosina e a uracila (Figura 3.16), designadas pelas letras T, C e U.

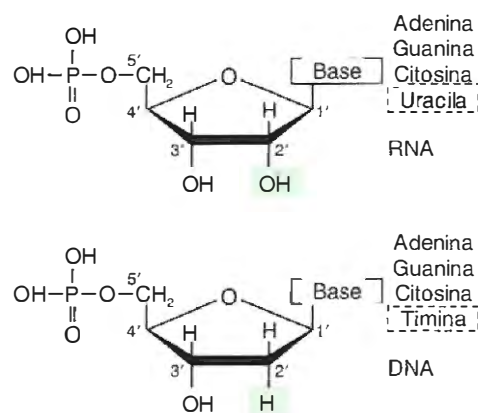



Figura 3.15 ▪ Nucleotídios do RNA e do DNA. As bases diferentes (uracila e timina) estão assinaladas. No carbono 29, a desoxirribose contém um átomo de oxigênio a menos (observar os retângulos azuis).

Além dos polímeros de nucleotídios, que constituem as moléculas dos ácidos nucleicos, as células contêm quantidades relativamente grandes de nucleotídios livres, desempenhando, sobretudo, as funções de coenzimas.

Por hidrólise parcial é possível retirar o radical fosfato dos nucleotídios. Aparecem então compostos denominados nucleosídios, constituídos por uma pentose e uma base púrica ou pirimídica (Figura 3.17).

Os ácidos nucleicos são moléculas informacionais que controlam os processos básicos do metabolismo celular, a síntese de macromoléculas, a diferenciação celular e a transmissão do patrimônio genético de uma célula para as suas descendentes.

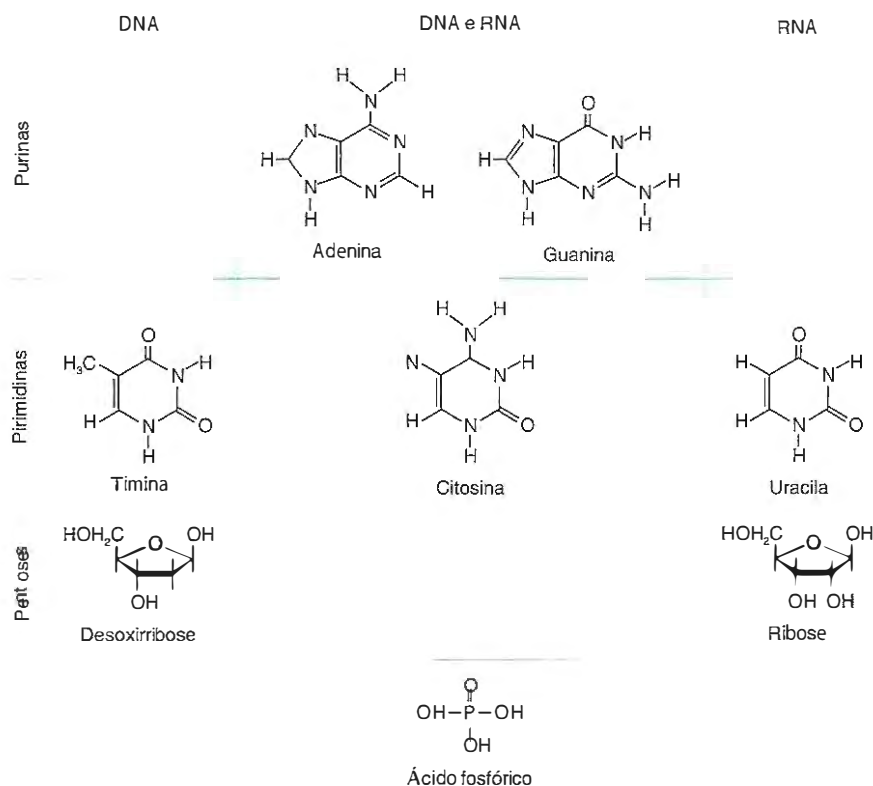



Figura 3.16 ▪ Componentes dos ácidos nucleicos (RNA e DNA).

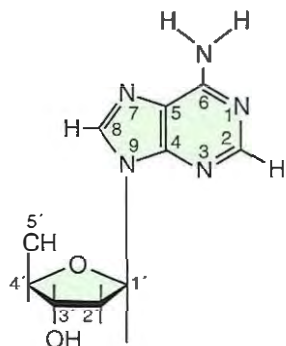



Figura 3.17 ▪ Estrutura molecular dos nucleosídios. No exemplo, o nucleosídio constituído pela adenina combinada à desoxirribose.

Cada molécula de ácido nucleico contém pelo menos uma cadeia de nucleotídios (polinucleotídio), formada por ligações diéster-fosfato entre os carbonos 3′ e 5′ da pentose, como mostra a Figura 3.18.

Distinguem-se dois tipos de ácidos nucleicos: o desoxirribonucleico ou DNA e o ribonucleico ou RNA. No DNA, a pentose encontrada é a desoxirribose, e as bases são adenina, guanina, citosina e timina. No RNA, a pentose é a ribose, e existe uridina em substituição à timina; as outras bases são comuns aos dois tipos de ácidos nucleicos (Tabela 3.3).

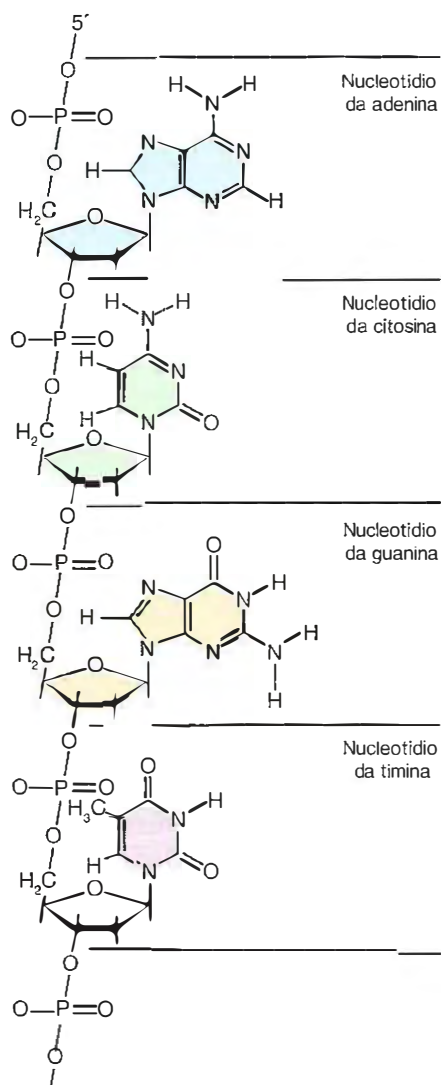



Figura 3.18 ▪ Polinucleotídio do DNA.

▪ O DNA é o repositório da informação genética e a transmite para as células-filhas

O ácido desoxirribonucleico ou DNA é o responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética. É encontrado principalmente nos cromossomos nucleares e, em pequenas quantidades, nos cromossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos. Nos cromossomos das células eucariontes, o DNA está associado a proteínas básicas, principalmente histonas.

A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídios dispostas em hélice em torno de um eixo. O passo dessas hélices é dirigido no sentido da esquerda para a direita (Figuras 3.19 e 3.20). A direção das ligações 3′ e 5′ diésterfosfato de uma cadeia é inversa em relação à da outra cadeia, como mostra a Figura 3.19. Diz-se que essas cadeias são antiparalelas. Em função disso, em cada extremidade da molécula uma das cadeias polinucleotídicas termina em 3′ e a outra em 5′ (Figura 3.19).

As bases púricas e pirimídicas de cada cadeia polinucleotídica situam-se dentro da hélice dupla, em planos paralelos entre si e perpendiculares ao eixo da hélice, como se fossem degraus de uma escada. Em cada plano ou "degrau da escada", a base de uma cadeia forma par com a base da cadeia complementar. Em razão das dimensões das moléculas das bases, o pareamento apenas tem lugar entre a timina e a adenina ou entre a guanina e a citosina das cadeias complementares. Portanto, considerando-se os dois polinucleotídios que constituem a molécula de DNA, as bases estão sempre pareadas na sequência T-A ou G-C, o que explica a existência, no DNA, de número igual de moléculas de T e A, e de G e C.

Na hélice dupla, as bases unem-se por meio de pontes de hidrogênio (Figura 3.19), principais responsáveis pela estabilidade da hélice. Quando as pontes de hidrogênio são rompidas – por exemplo, pelo aquecimento do DNA em solução –, os dois filamentos polinucleotídicos da hélice sofrem desnaturação, separando-se; quando baixa a temperatura, eles se unem novamente.

A desnaturação pelo rompimento das pontes de hidrogênio pode ser completa ou parcial (Figura 3.21). Essa desnaturação ocorre mais cedo nas ligações AT, que têm duas pontes de hidrogênio, sendo as ligações CG mais resistentes, pois têm três pontes de hidrogênio (Figura 3.19). A desnaturação parcial permite a identificação das zonas ricas em AT e das zonas ricas em CG, sendo esses últimos segmentos mais resistentes à desnaturação. Em moléculas simples de DNA, como as dos bacteriófagos, essa técnica possibilita a localização de zonas com diferentes frequências de nucleotídios ao longo do filamento de DNA.

Ao longo da molécula de DNA, cada volta completa da hélice contém 10 nucleotídios (Figura 3.20). A hélice dupla tem um diâmetro de 2 nm, e sua superfície mostra dois sulcos, um dos quais mais acentuado que o outro.

As bases (hidrofóbicas) situam-se dentro da hélice, e os resíduos de desoxirribose (hidrofílicos) e de ácido fosfórico (ionizado e hidrofílico) localizam-se na periferia, em contato com a água intracelular. Ao lado das pontes de hidrogênio que representam o elemento principal de união

Tabela 3.3 ▪ Características dos principais tipos de ácidos nucleicos.

	DNA	tRNA	mRNA	rRNA
Componentes	Ácido fosfórico, desoxirribose, adenina, guanina, citosina e timina	Ácido fosfórico, ribose, adenina, guanina, citosina, uracila, timina, ácido pseudouridílico, metilcitosina, dimetil-guanina	Ácido fosfórico, ribose, adenina, guanina, citosina e uracila	Ácido fosfórico, ribose, adenina, guanina, citosina e uracila
Funções	Comanda todo o funcionamento da célula; transmite a informação genética para as outras células	Transporta os aminoácidos, unindo o seu anticódon ao códon do mRNA; determina a posição dos aminoácidos nas proteínas	Através da sequência de suas bases, determina a posição dos aminoácidos nas proteínas	Combina-se com o mensageiro para formar os polirribossomos
Localização	Núcleo das células eucariontes, nucleoide das procariontes; mitocôndrias e cloroplastos; alguns vírus	Principalmente no citoplasma; menor quantidade no núcleo	Principalmente no citoplasma; menor quantidade no núcleo	Principalmente no citoplasma; menor quantidade no núcleo
Tamanho da molécula	Muito grande; difícil de determinar	25 a 30 kDa (quilodáltons)	Depende do tamanho da proteína que codifica; variável entre 5×10^4 a 5×10^{16} dáltons	5 S a 28 S (S = Svedberg)
Forma	Hélice dupla; Filamento simples, em certos vírus	"Folha de trevo"	Filamento simples	Ribossomo; tamanho: células eucariontes 2,3 nm (80 S), células procariontes 1,8 nm (70 S)

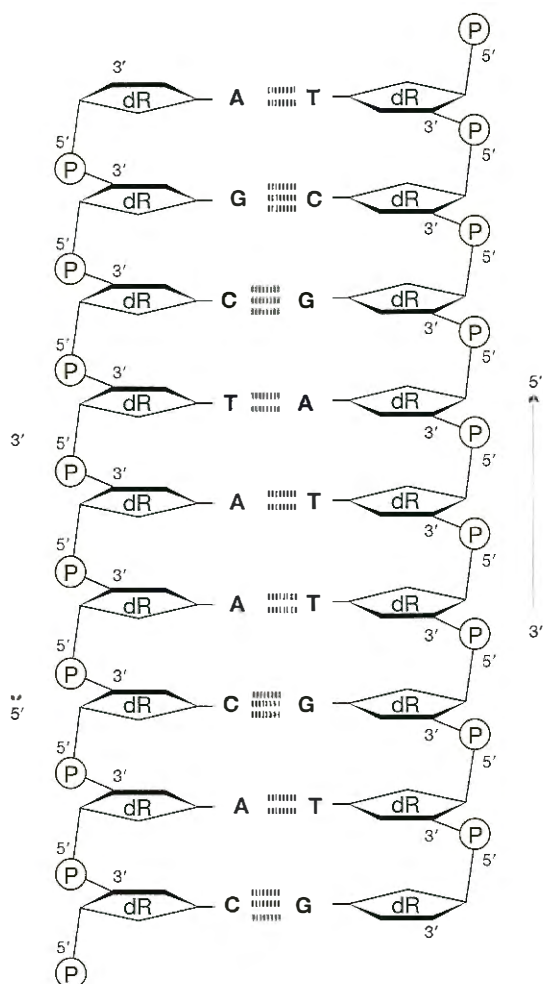
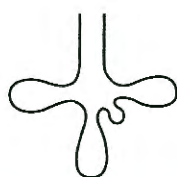



Figura 3.19 ▪ Pequena parte de uma molécula de DNA mostrando o arranjo antiparalelo dos polinucleotídios. Entre T e A existem duas pontes de hidrogênio e, entre G e C, três.

entre os dois filamentos polinucleotídicos da hélice dupla, a interação hidrofóbica das bases pareadas contribui para manter a estabilidade da hélice de DNA. Os grupos fosfóricos, ionizados negativamente, permitem ao ácido desoxirribonucleico combinar-se com proteínas básicas, isto é, carregadas positivamente, ou com outras moléculas eletricamente positivas.

Em razão de sua fragilidade e de seu enorme comprimento, tem sido difícil determinar o tamanho exato das moléculas de DNA. Sabe-se, por exemplo, que a molécula de DNA do bacteriófago lambda, que infecta a bactéria *Escherichia coli*, tem um peso de 32 milhões de dáltons e comprimento de 17,2 mm. Na *Escherichia coli*, o cromossomo é uma molécula de DNA, com comprimento de 1,2 mm e peso molecular de 2,8 bilhões de dáltons.

O RNA transfere a informação genética do DNA para as proteínas

Ao contrário do DNA, cuja molécula quase sempre é formada por duas cadeias polinucleotídicas, a molécula de RNA é um filamento único, e só existe, excepcionalmente, sob a forma de filamentos duplos complementares. Nos dois casos, as exceções são encontradas nos vírus: alguns têm DNA em filamento único, enquanto outros têm RNA em cadeia dupla complementar.

Dos pontos de vista funcional e estrutural, distinguem-se três variedades principais de ácido ribonucleico:

- RNA de transferência ou tRNA
- RNA mensageiro ou mRNA
- RNA ribossômico ou rRNA.

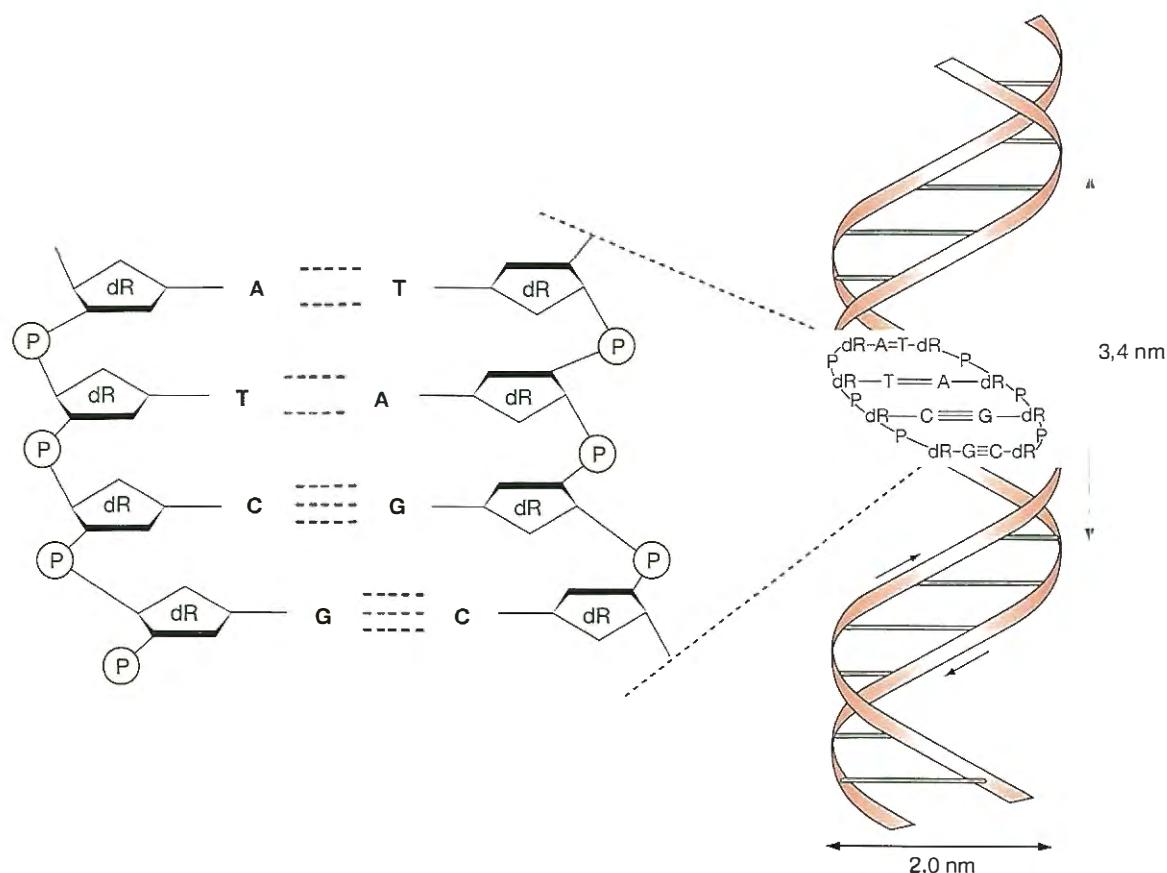



Figura 3.20 ▪ Esquema da estrutura em hélice dupla do DNA, segundo Watson e Crick. A, adenina; T, timina; C, citosina; G, guanina; P, fosfato e S, desoxirribose.

▪ RNA de transferência

Dos três tipos de ácidos ribonucleicos, o tRNA é o que tem moléculas menores; são constituídas de 75 a 90 nucleotídios e têm peso molecular entre 23 kDa e 30 kDa. Sua função é transferir os aminoácidos para as posições corretas nas cadeias polipeptídicas em formação nos complexos de ribossomos e RNA mensageiro (polirribossomos). Para isso, o tRNA tem a propriedade de se combinar com aminoácidos e é capaz de reconhecer determinados locais da molécula do mRNA constituídos por uma sequência de três bases. Essas sequências, típicas para cada aminoácido, são denominadas códon. A sequência de três bases na molécula do tRNA e que reconhece o códon chama-se anticódon (Figura 3.22). Para cada aminoácido existe pelo menos um tRNA.

A molécula do tRNA é um filamento com uma extremidade terminando sempre pela sequência CCA, isto é, pelo ácido adenílico (A) precedido de duas moléculas de ácido citidílico (C).

Graças a um processo enzimático que consome energia liberada por hidrólise de ATP (Capítulo 4), uma hidroxila do ácido adenílico da extremidade CCA é esterificada por um L-aminoácido, formando-se assim uma molécula de Acil-tRNA. A enzima catalisadora dessa esterificação é específica para cada aminoácido. A molécula do tRNA apresenta uma região que é reconhecida pela enzima, e, desse modo, cada aminoácido é ligado ao seu tRNA.

Em razão das pontes de hidrogênio que se estabelecem entre as suas bases, todos os tRNA apresentam segmentos das moléculas formados por uma hélice dupla. A representação plana, esquemática, da molécula do tRNA (Figura 3.22) tem o aspecto de uma folha de trevo, a qual mostra o anticódon em um de seus lados.

Além das bases adenina, guanina, citosina e uracila, comumente encontradas no RNA, o tRNA contém outras bases que não aparecem nos outros tipos de ácido ribonucleico (Tabela 3.3). Entre essas bases típicas do tRNA, estão, por exemplo, a hipoxantina e a metilcitosina. O tRNA tem ainda ácido ribotimidílico, que é um nucleotídio constituído por ácido fosfórico, ribose e timina, base geralmente encontrada no DNA. Além disso, o tRNA apresenta em sua molécula o ácido pseudouridílico, que difere do ácido uridílico comum por apresentar a ribose ligada ao carbono 5 da uracila, e não ao nitrogênio 3, como é habitual (Figura 3.23). Em conclusão, vê-se que o tRNA apresenta características que o diferenciam dos outros tipos de RNA, facilitando a sua identificação.

As regiões do tRNA que contêm as bases não habituais talvez sejam importantes para determinar o formato da molécula, pois nessas regiões não se formam pontes de hidrogênio entre as bases (Figura 3.22).

Os tRNA são inicialmente sintetizados sobre os filamentos de DNA, como moléculas maiores que passam por um processamento (*splicing*) tornando-se menores, antes de migrarem para o citoplasma. Esse processamento do tRNA consiste na remoção de determinados pedaços da molécula maior e soldagem dos fragmentos que vão constituir a molécula final do tRNA. É um processo semelhante ao que será descrito adiante neste capítulo ao se examinar o mRNA, onde o assunto tem sido mais estudado.

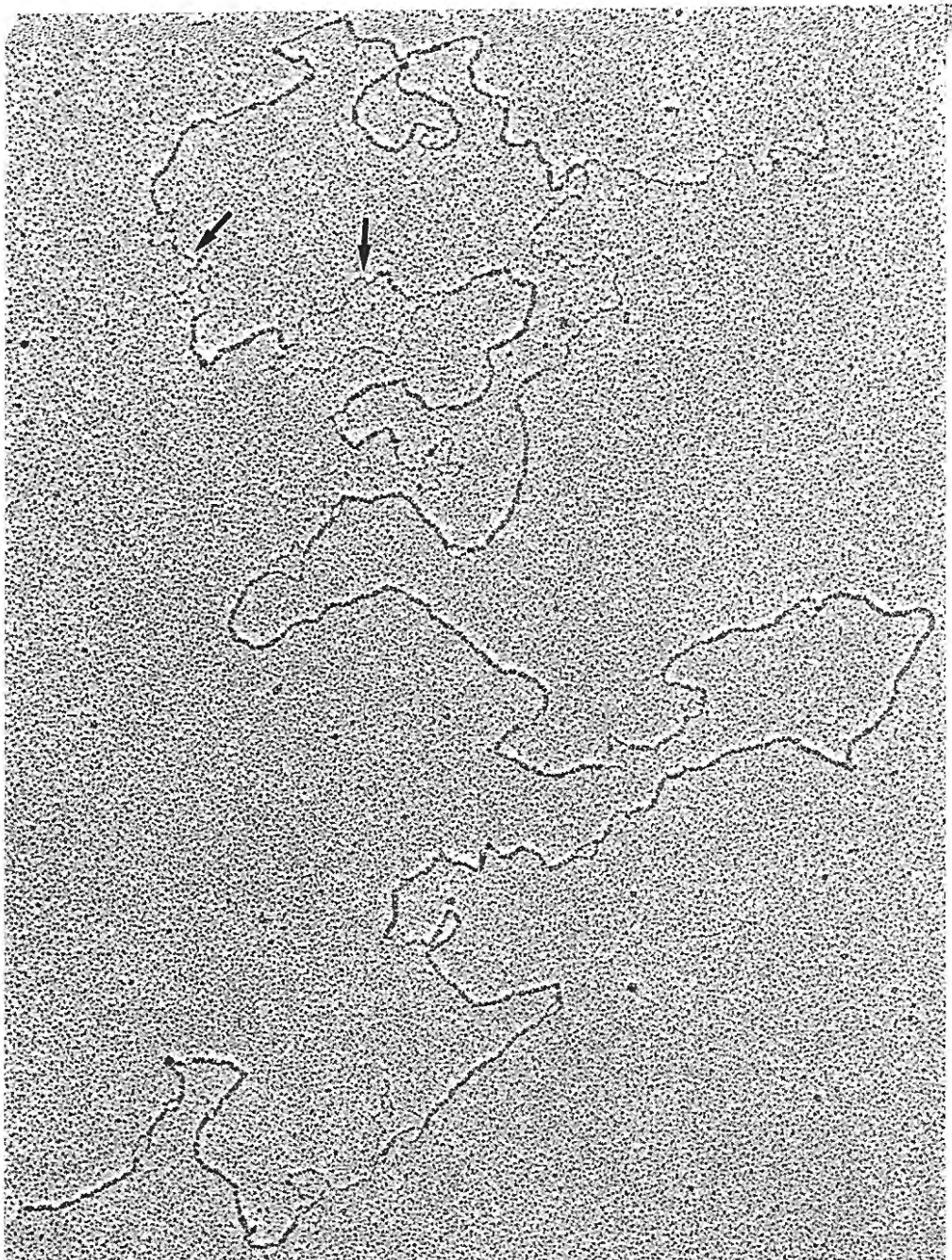



Figura 3.21 ▪ Desnaturação parcial da molécula de DNA do bacteriófago T7. A separação dos segmentos polinucleotídicos é mais precoce nos segmentos com abundância de ligações AT (*setas*) porque entre A e T existem apenas duas pontes de hidrogênio. Micrografia eletrônica. (H.J. Vollenweider, J.M. Sogo and T. Koller. *Proc. Nat. Acad. Sci. EUA*, 72:83, 1975. Reproduzida com autorização.)

▪ RNA mensageiro

O mRNA é sintetizado nos cromossomos, como os demais RNA da célula, e representa a transcrição de um segmento de uma das cadeias da hélice de DNA. Nota-se que, durante a síntese do mRNA, os filamentos de um segmento da molécula de DNA separam-se temporariamente. O peso molecular do mRNA varia de acordo com o tamanho da molécula proteica que ele irá codificar no citoplasma. Evidentemente, a molécula de mRNA é bem maior do que a de proteína por ele formada, porque são necessários três nucleotídios para codificar um aminoácido. Além disso, muitas proteínas são sintetizadas com um segmento extra, formado por vários aminoácidos que são removidos no acabamento final da proteína. Por isso, o peso molecular dos mRNA é da ordem de centenas e até milhares de dáltons. Nas células procariontes, as moléculas de mRNA podem ser ainda maiores, porque nas bactérias uma longa molécula de mRNA pode ser traduzida a partir de locais diferentes, originando mais de uma proteína, conforme o local do mRNA em que a tradução teve início.

Cada molécula de mRNA tem um prolongamento (*tail*) de poli-A que é adicionado ainda no interior do núcleo celular, assim que a molécula de mRNA é transcrita, por uma enzima que não requer molde (*template*) de DNA. Portanto, esse segmento do mRNA não está codificado no DNA. Na outra extre-

Anticódon

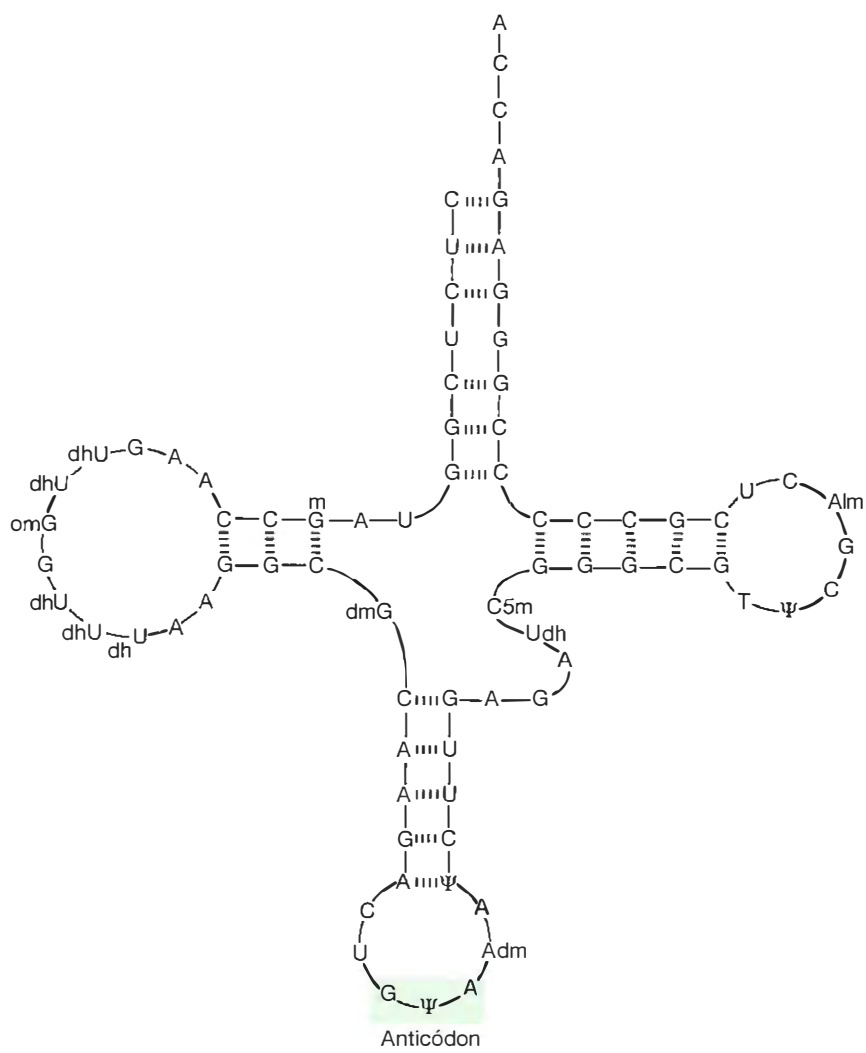



Figura 3.22 ▪ Estrutura do RNA de transferência para o aminoácido tirosina. Além das bases habituais, esse tRNA contém as seguintes bases: **mG** = N-2-metilguanosina; **dhU** = N-6-di hidrouridina; **omG** = 2'-O-metilguanosina; **dmG** = 2'-dimetilguanosina; **dmA** = N-6-dimetiladenosina; **5mC** = 5-metilcitosina. A letra grega psi (Ψ) representa o ácido pseudouridílico.

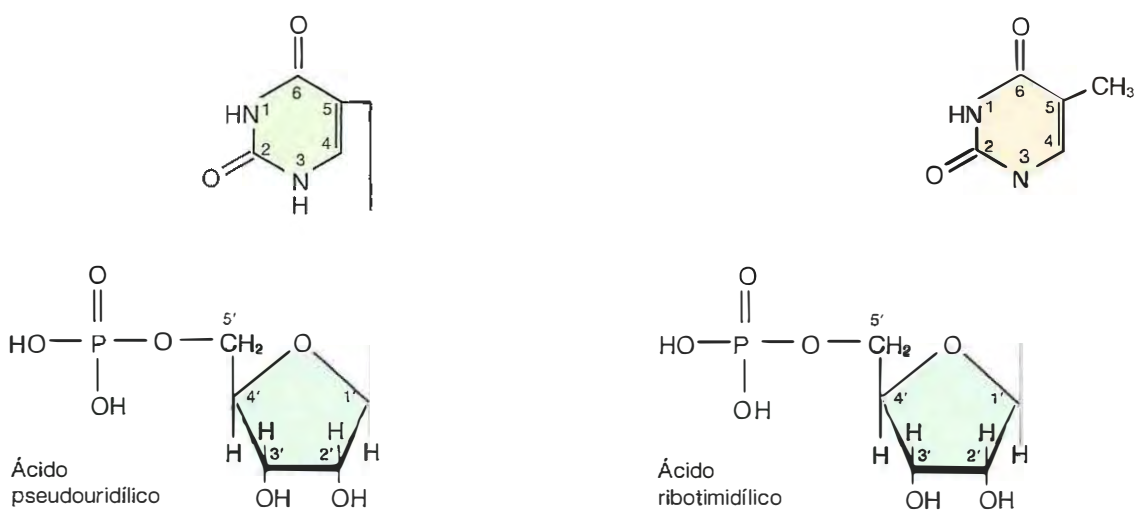



Figura 3.23 ▪ Dois nucleotídios encontrados no tRNA: no ácido pseudouridílico, a ribose liga-se ao carbono 5 da uridina, e não ao carbono 3, como ocorre no ácido uridílico. O ácido ribotimidílico contém timina, uma base que, em geral, é encontrada no DNA.

midade do mRNA (extremidade 5′), um pequeno capuz (*cap*) nucleotídico é adicionado por outras enzimas.

Os mRNA citoplasmáticos derivam de precursores nucleares conhecidos como hnRNA (*heterogenous* RNA), assim chamados por apresentarem grande heterogeneidade nos pesos moleculares e na composição de nucleotídios. A maioria dos hnRNA tem moléculas enormes, com até 50.000 nucleotídios. Essas moléculas são partidas no núcleo, de modo ordenado. Certos pedaços são removidos e as extremidades dos segmentos que codificam proteínas se soldam (*splicing*), formando-se a molécula acabada de mRNA, que migra para o citoplasma.

Fica claro do exposto que, nas células eucariontes, o DNA que transcreve os mRNA é constituído por partes que vão ser traduzidas em proteínas, denominadas éxons, e em partes que apenas separam os éxons. Essas partes "silenciosas" são denominadas íntrons (Capítulo 9).

Portanto, o DNA inicialmente transcreve uma molécula enorme de hnRNA da qual os segmentos sem significado para a síntese proteica são removidos, ocorrendo então a soldagem precisa dos segmentos que levam a codificação para um tipo de molécula proteica e, assim, fica formada uma molécula de mRNA. Todavia, alguns genes não contêm íntrons e as moléculas de mRNA se formam diretamente do DNA, sem passar pela fase de hnRNA.

Íntrons e hnRNA só foram encontrados em células eucariontes, sendo muito pouco provável que existam nas procariontes.

RNA ribossômico

O RNA ribossômico é muito mais abundante que os outros dois tipos de RNA, constituindo 80% do RNA celular. Existe combinado com proteínas, formando partículas facilmente visíveis ao microscópio eletrônico e denominadas ribossomos. Quando presos a filamentos de RNA mensageiro, os ribossomos formam os polirribossomos (Figura 3.24), nos quais tem lugar a síntese de proteínas.

Existem nas células dois tipos de ribossomos que se distinguem por seus coeficientes de sedimentação determinados na ultracentrífuga e expressos em unidades S ou Svedberg. Os ribossomos das células procariontes têm coeficiente de sedimentação de 70 S e são menores do que os ribossomos das células eucariontes, cujo coeficiente de sedimentação é de 80 S. Ambos os tipos de ribossomos são formados por duas subunidades, uma maior e outra menor, com características funcionais e estruturais diferentes.

Figura 3.24 ▪ Combinação do RNA mensageiro com ribossomos para formar polirribossomos.

As subunidades se prendem de modo reversível no início da síntese da molécula proteica, separando-se quando a proteína está terminada. A subunidade maior dos ribossomos das células eucariontes contém três tipos de RNA, com sedimentação de 28 S, 5,8 S e 5 S, e a dos ribossomos das procariontes, dois tipos de RNA: um de 23 S e outro de 5 S. A subunidade menor apresenta apenas um tipo de RNA: 18 S nas células eucariontes e 16 S nas procariontes.

Os ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos são iguais aos das células procariontes, dado que apoia a interpretação de que essas duas organelas transdutoras de energia se originaram de bactérias que se tornaram simbiontes das células eucariontes.

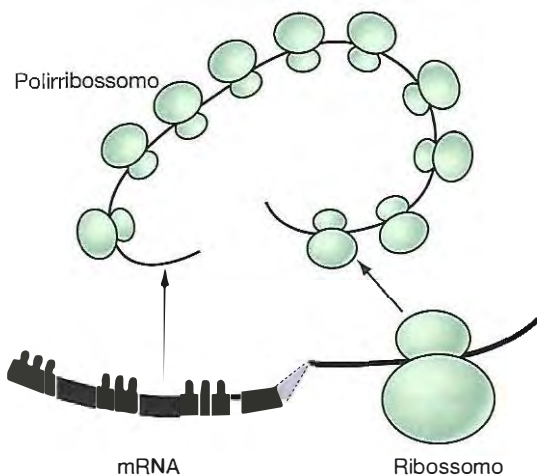
Cerca de 50 variedades de proteínas foram identificadas nos ribossomos e constituem aproximadamente a metade da massa desses corpúsculos.

A basofilia citoplasmática demonstrável pelos corantes básicos e removível pela ribonuclease deve-se aos ribossomos. Estes são particularmente abundantes nas células que sintetizam grandes quantidades de proteínas, as quais têm o citoplasma fortemente basófilo.

O RNA pode ter ação enzimática

Em alguns casos, o RNA tem ação catalítica, atuando como uma enzima. A atividade catalítica do RNA foi descoberta ao se estudar a síntese dos RNA de *Tetrahymena*, um protozoário ciliado. Descobriu-se que esses RNA são inicialmente moléculas muito grandes das quais determinados segmentos são removidos e as partes restantes são soldadas (*splicing*), formando-se, assim, a molécula final do mRNA. Todo o processo se realiza, como foi comprovado *in vitro*, sem a participação de proteínas enzimáticas. O segmento de RNA que será removido (íntron) catalisa sua própria remoção e a união das extremidades da molécula partida. Esse segmento de RNA, *in vitro*, é capaz de catalisar a polimerização de polinucleotídios pequenos em polinucleotídios com mais de 30 nucleotídios, tendo sido chamado de ribozima.

Outros RNA com atividade catalítica foram descobertos logo depois, como, por exemplo, os tRNA, que, quase sempre, também são sintetizados em tamanho maior. Nesse caso, foi observado que a clivagem para produzir a molécula de tRNA final, de tamanho menor, é catalisada por um complexo RNA-proteína (ribonuclease P); mas a especificidade e a atividade enzimática desse complexo dependem mais do RNA do que da proteína. Separando-se o complexo RNA-proteína em suas duas partes, somente o RNA tem atividade catalítica, embora o complexo inteiro seja mais ativo. Portanto, nesse caso o RNA é essencial para a atividade enzimática e a proteína exerce um papel auxiliar, secundário.

A descoberta de que o RNA pode ter atividade enzimática teve grande repercussão sobre as hipóteses quanto à origem

da vida na Terra. É possível que a molécula inicial das futuras células tenha sido um RNA capaz de autorreplicação. Esse RNA primordial teria servido de molde (*template*) para o DNA, iniciando em seguida a síntese dirigida das proteínas.

As moléculas de ácidos nucleicos podem ser caracterizadas pela técnica de hibridização

Existem no citoplasma muitos RNA diferentes, necessários para a síntese das numerosas proteínas celulares. A caracterização dos RNA mensageiros não é fácil. Uma técnica que se tem mostrado muito útil para o seu estudo é a hibridização com DNA. A hélice dupla de DNA é formada por duas cadeias unidas por pontes de hidrogênio que são forças fracas. Essas duas cadeias podem ser separadas facilmente pelo aquecimento brando e podem se recombinar pelo resfriamento lento; em contrapartida, as cadeias de DNA separadas podem combinar-se com moléculas de RNA, processo muito seguro para caracterizar uma molécula de RNA, pois ela se combina exclusivamente com o segmento de DNA do qual foi transcrita.

Os lipídios formam reservas nutritivas e têm papel estrutural nas membranas celulares

Os compostos de carbono extraídos de células e tecidos por solventes orgânicos não polares – como éter, clorofórmio e benzeno – são chamados lipídios. Em virtude de serem definidos por sua solubilidade nesses solventes, e não pela estrutura química, o grupo dos lipídios compreende substâncias com moléculas muito diferentes.

De acordo com suas funções principais, os lipídios celulares podem ser divididos em duas categorias: lipídios de reserva nutritiva e lipídios estruturais. Estes têm papel relevante na manutenção da estrutura das membranas celulares (Capítulo 5).

As vitaminas A, E e K são lipídios dotados de importantes atividades fisiológicas. Os hormônios esteroides, entre os quais os da adrenal, ovário e testículo, e o 1,25-di-hidroxicolecalciferol (substância ativa formada no organismo dos mamíferos a partir da "vitamina" D) são lipídios informacionais (transportam informações). Todavia, como exercem funções especializadas, e não são constituintes gerais das células, não serão estudados neste capítulo.

▸ **Lipídios de reserva nutritiva.** As reservas nutritivas de natureza lipídica consistem principalmente de triacilgliceróis (triglicerídios). São compostos formados de ácidos graxos combinados a glicerol por ligações ésteres que são formadas com a remoção de água (Figura 3.25). Os triglicerídios são sintetizados pela adição de um ácido graxo de cada vez. Assim sendo, monoglicérides contêm apenas um ácido graxo esterificado; diglicérides contêm dois e triglicerídios, três ácidos graxos. Os glicérides, com predominância de triglicerídios, estão presentes no citoplasma de quase todas as células; porém, há células especializadas para o armazenamento desses compostos ricos em energia, denominadas células adiposas.

Os ácidos graxos de um triglicerídio podem ser idênticos, mas geralmente variam no tamanho de suas moléculas e no grau de saturação. Diz-se saturado o ácido graxo que não apresenta ligações duplas entre seus átomos de carbono e não podem receber mais átomos de H.

Embora representem principalmente reserva energética, os triacilglicérides desempenham outras funções. Por exemplo, como são bons isolantes térmicos, oferecem proteção contra o frio para animais que vivem em ambientes em que a temperatura é baixa, como ursos, pinguins e outros. Nesses animais existe uma camada de células adiposas sob a pele, que funciona como eficiente isolante térmico.

Os triglicerídios que contêm muitos ácidos graxos saturados são sólidos ou semissólidos na temperatura ambiente, sendo chamados de gorduras. As gorduras predominam no corpo dos animais. Nas plantas, a maioria dos triglicerídios são líquidos na temperatura ambiente e são conhecidos como óleos vegetais. A abundância de ácidos graxos insaturados, cujas moléculas têm forma irregular, impede a ordenação das moléculas para constituir o estado sólido. Por isso, os óleos vegetais têm ponto de fusão mais baixo. Esses óleos são metabolizados mais facilmente pelo organismo dos animais.

Todavia, os óleos vegetais podem ser convertidos em uma massa sólida pelo processo industrial de hidrogenação.

▸ **Lipídios estruturais.** Esses lipídios são componentes estruturais de todas as membranas celulares: membrana plasmática, envoltório nuclear, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, endossomos, mitocôndrias, cloroplastos, lisossomos etc. Muitas propriedades dessas membranas decorrem das características químicas e físicas de seus lipídios. Os lipídios estruturais são mais complexos que os de reserva. Suas moléculas são longas e dotadas de uma extremidade polar – isto é, com carga elétrica – e uma longa cadeia apolar, não ionizada. A extremidade polar é hidrofílica, enquanto a porção apolar, constituída geralmente por duas cadeias alifáticas, é hidrofóbica e, portanto, solúvel em lipídios.

Os lipídios que exercem papel essencialmente estrutural, fazendo parte do sistema de membranas das células, são os fosfolipídios (fosfoglicerídios e esfingolipídios), os glicolipídios e o colesterol.

$CH_2O\ H \quad HO\ OC(CH_2)_nCH_3$
$CHO\ H \quad HO\ OC(CH_2)_nCH_3$
$CH_2O\ H \quad HO\ OC(CH_2)_nCH_3$

$\rightarrow$

$H-C(H)-O-C(=O)-(CH_2)_nCH_3$
$H-C-O-C(=O)-(CH_2)_nCH_3 + 3H_2O$
$H-C(H)-O-C(=O)-(CH_2)_nCH_3$

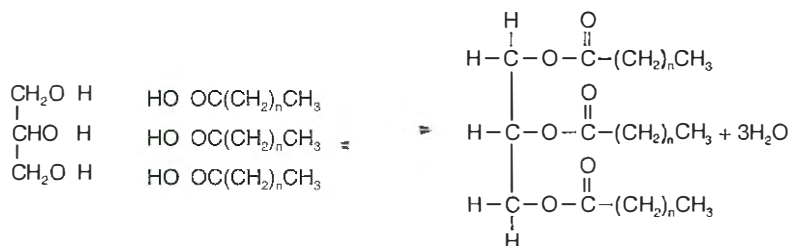



Figura 3.25 ▪ Substituição das hidroxilas da glicerina por ácidos graxos, para formar uma molécula de triacilglicerol ou triglicerídio (gordura neutra).

Fosfoglicerídios. Nesses fosfolipídios, uma das hidroxilas primárias, isto é, a do carbono 1 ou a do 3 do glicerol, é esterificada pelo ácido fosfórico. As outras duas hidroxilas são esterificadas por ácidos graxos, sendo o ácido graxo do carbono 2 em geral insaturado (Figura 3.26).

O fosfoglicerídio mais simples é o ácido fosfatídico, constituído apenas por um resíduo de glicerol, um de ácido fosfórico e dois de ácidos graxos. O ácido fosfatídico existe em pequena quantidade nas membranas celulares. Os fosfoglicerídios mais encontrados nessas membranas são fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol.

Esfingolipídios. Um exemplo de esfingolipídio é a esfingomielina, muito abundante nas bainhas de mielina do tecido nervoso. A bainha de mielina funciona como isolante elétrico de prolongamentos das células nervosas, sendo formada por dobras concêntricas da membrana plasmática de células especializadas.

A esfingomielina é constituída por uma molécula de colina, uma de ácido fosfórico, uma de esfingosina e uma de ácido graxo (Figura 3.27).

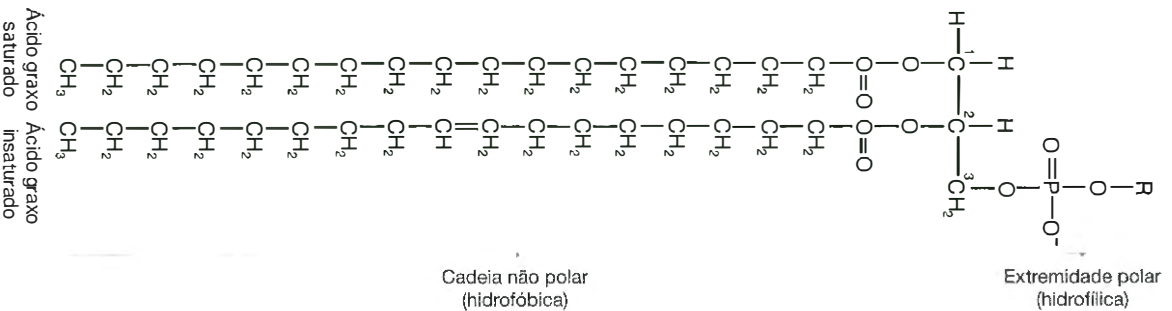



Figura 3.26 ▪ Fórmula dos fosfoglicerídios. O radical R pode ser a colina, a etanolamina, a serina ou a treonina. Esses fosfolipídios são denominados fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidiltreonina, respectivamente.

A principal característica estrutural dos esfingolipídios é a presença da longa cadeia de esfingosina, ao lado de uma cadeia de ácido graxo, que se prende à esfingosina por uma ligação éster (Figura 3.27). Tal como os fosfoglicerídios, os esfingolipídios têm uma extremidade polar e duas caudas apolares.

Os glicolipídios têm extremidades polares formadas por glicídios, principalmente D-galactose (Figura 3.28). Suas moléculas são, em geral, constituídas por moléculas glicídicas, uma molécula de glicerol e duas de ácidos graxos. Os glicolipídios não contêm ácido fosfórico. Entre os glicolipídios importantes, encontram-se os gangliosídeos, que apresentam glicídios muito complexos. Por exemplo, do tecido nervoso isolou-se o gangliosídeo G_{M2} constituído pelas seguintes moléculas: um ácido graxo, esfingosina, D-glicose, D-galactose, N-acetil-D-galactosamina e ácido N-acetilneuramínico.

Os cerebrosídeos (Figura 3.29) são glicoesfingolipídios, pois suas moléculas contêm esfingosina e glicídios. Os cerebrosídeos são abundantes nas membranas das células do tecido nervoso, sobretudo nas bainhas de mielina.

Colesterol. O colesterol é um esterol, isto é, um composto que contém o núcleo peridrociclopentanofenantreno, com

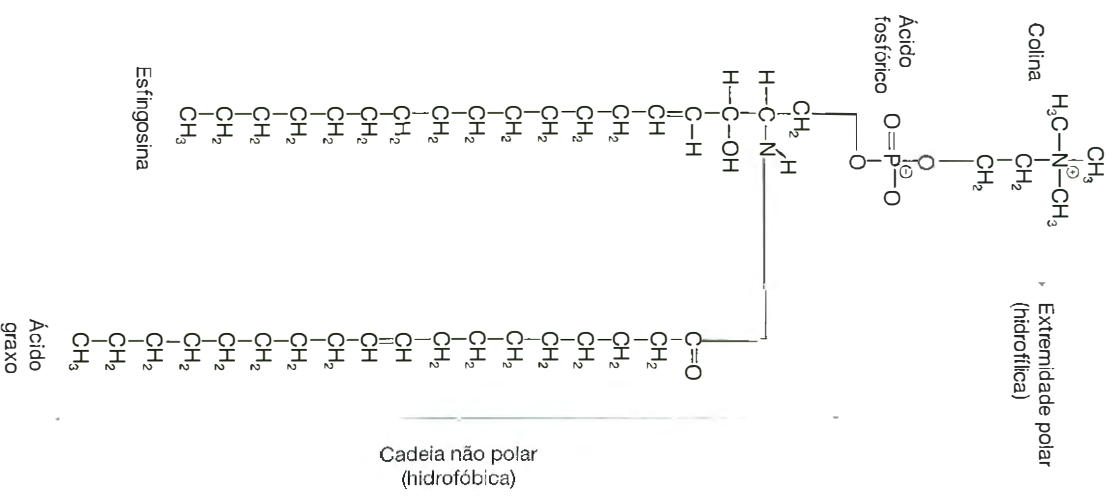



Figura 3.27 ▪ Fórmula da molécula de esfingomielina.

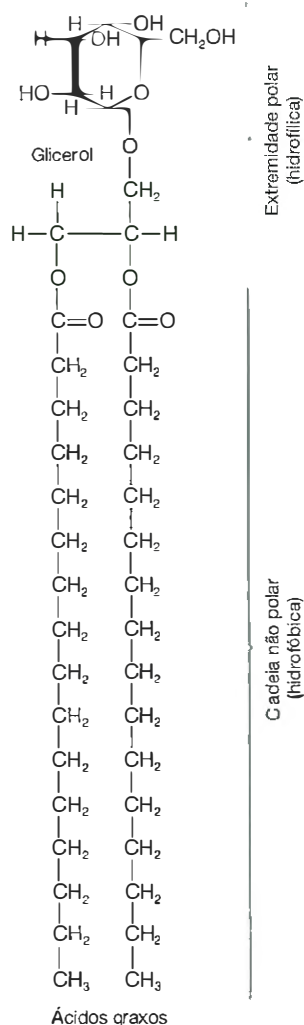



Figura 3.28 ▪ Fórmula da molécula de um glicolipídio.

uma hidroxila no carbono 3 e uma cadeia alifática, com oito ou mais átomos de carbono, ligada ao carbono 17 do núcleo (Figura 3.30).

O colesterol está presente na membrana plasmática das células animais, ocorrendo, porém, em quantidade muito menor nas membranas das mitocôndrias e do retículo endoplasmático. O colesterol reduz a fluidez das membranas (Capítulo 5).

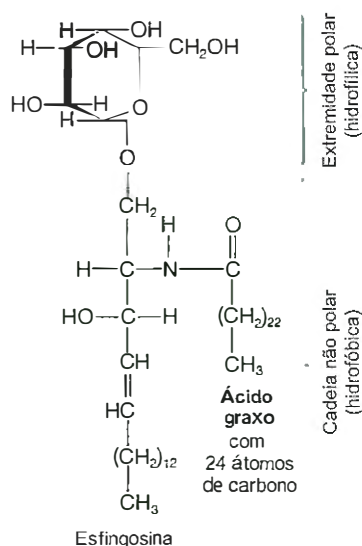



Figura 3.29 ▪ Fórmula da molécula de um cerebrosídeo.

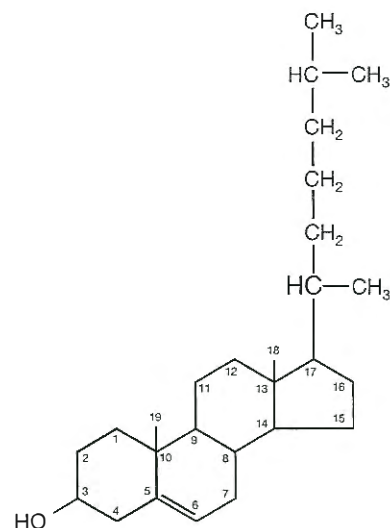



Figura 3.30 ▪ Fórmula da molécula do colesterol. A parte cíclica da molécula é comum a todos os esteróis.

As células dos vegetais não contêm colesterol, que é então substituído por outros esteróis, denominados coletivamente de fitoesteróis.

A presença de longas cadeias hidrofóbicas nos lipídios é de grande importância biológica, pois são elas que possibilitam a interação hidrofóbica responsável pela associação de lipídios para formar a bicamada lipídica das membranas celulares. A fixação das proteínas integrais das membranas se dá pela interação das porções hidrofóbicas das moléculas dessas proteínas com os lipídios das membranas. A interação hidrofóbica também é importante no transporte de lipídios no plasma. Por exemplo, os esteroides circulam presos a uma região hidrofóbica da superfície da molécula de albumina, que é solúvel em água.

Os lipídios têm menor diversidade funcional do que as proteínas e polissacarídios; apresentam, principalmente, função energética e estrutural. Sua atividade informacional é restrita a alguns hormônios esteroides.

Os polissacarídios formam reservas nutritivas e unem-se a proteínas para formar glicoproteínas (função enzimática e estrutural) e proteoglicanas (função estrutural)

Os polissacarídios são polímeros de monossacarídios. Há polissacarídios com moléculas lineares, enquanto outros têm moléculas ramificadas. A molécula de alguns polissacarídios é constituída pela repetição de um único tipo de monossacarídio; são os polissacarídios simples ou homopolímeros. Por exemplo, o amido e o glicogênio são polímeros simples de D-glicose e não contêm outro tipo de molécula. Os polissacarídios complexos (heteropolímeros), constituídos por mais de um tipo de monossacarídio, são menos frequentes nas células, porém alguns são biologicamente muito importantes.

Os polissacarídios associados à superfície externa da membrana celular desempenham papel estrutural e informacional, muitas vezes fazendo parte das moléculas dos receptores. São encontrados também como reserva nutritiva, que a célula utiliza quando há necessidade metabólica.

▸ **Polissacarídios de reserva.** Os polissacarídios de reserva são o glicogênio, nas células animais, e o amido, nas células das plantas; ambos são polímeros da D-glicose.

▸ **Glicogênio.** O glicogênio ocorre no citoplasma das células animais sob a forma de grânulos, com diâmetro de 15 a 30 nm, geralmente dispostos em aglomerados (Capítulo 1, Figura 1.7). Os grânulos de glicogênio, além do polissacarídio, contêm proteínas, como as enzimas responsáveis pela síntese e despolimerização do glicogênio.

A D-glicose recebida em excesso pela célula é adicionada, por processo enzimático, às extremidades da molécula de glicogênio. Nos momentos de necessidade, também por atividade enzimática, libertam-se moléculas de D-glicose, que serão utilizadas para os processos metabólicos da célula. Algumas células, como as do fígado, lançam glicose no sangue, para manter estável a concentração desse açúcar no plasma sanguíneo, o que é de grande importância para as funções dos diversos tecidos do corpo.

A molécula de glicogênio tem dimensões variáveis e é muito ramificada em todas as direções do espaço. A Figura 3.31 é a sua representação esquemática, em duas dimensões.

▸ **Amido.** Ao contrário da célula animal, que armazena glicogênio, a célula vegetal tem amido como reserva energética. O amido é composto de dois tipos de moléculas: a amilose, um polímero linear, e a amilopectina, um polímero ramificado, ambos constituídos por unidades de glicose.

▸ **Polissacarídios estruturais e informacionais.** Além dos polissacarídios de reserva nutritiva (glicogênio e amido), as células sintetizam outros polissacarídios que fazem parte da superfície celular, onde participam do reconhecimento entre as células para constituir os tecidos, da constituição dos receptores celulares e das ligações estruturais entre o citoplasma e a matriz extracelular (Capítulo 12).

Combinados com proteínas, os polissacarídios estruturais fazem parte do glicocálice das células animais, da parede das células bacterianas e da parede das células das plantas. A maioria dos polissacarídios estruturais e informacionais são heteropolímeros. Devido à sua complexidade, a estrutura de muitos deles não foi ainda elucidada. Eles constituem as glicosaminoglicanas, que se ligam a proteínas para formar as proteoglicanas, e a porção glicídica das glicoproteínas, cuja estrutura geral será explicada no Capítulo 12. A Tabela 3.4 oferece uma visão geral da diversidade funcional e estrutural dos principais componentes macromoleculares das células. Os polissacarídios têm funções energéticas, estruturais e informacionais (glicocálice, hormônios glicoproteicos).

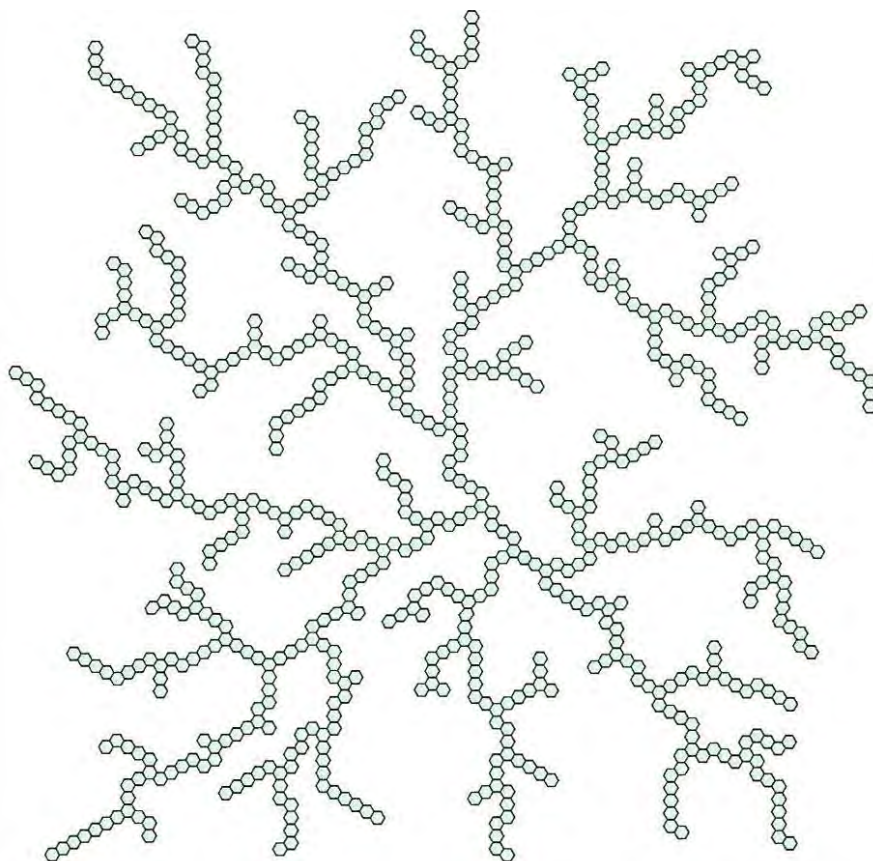



Figura 3.31 ▪ Esquema plano da molécula de glicogênio que, na realidade, ramifica-se em todas as direções do espaço, como os galhos de uma árvore. Cada círculo representa um resíduo de glicose.

Tabela 3.4 ▪ Principais funções celulares das moléculas – em ordem crescente de sua diversidade funcional.

Tipo de molécula	Ácido nucleico (DNA e RNA)	Lipídio	Polissacarídio	Proteína
Grau de diversidade funcional	1	2	3	4
Funções	Informacional	Energética Estrutural Informacional	Energética Estrutural Informacional	Enzimática Estrutural Informacional Movimentação celular Energética

Resumo

Existe, nas células, preponderância absoluta dos compostos de carbono, embora eles sejam extremamente raros na litosfera (crosta terrestre). Isso sugere que as primeiras células foram constituídas com esses compostos e que essa seleção foi transmitida às células seguintes, durante o processo evolutivo. As funções vitais dependem da presença de macromoléculas poliméricas de compostos de carbono. Esses polímeros são constituídos pela associação, em número variável, de unidades ou monômeros, que podem ser iguais, nos homopolímeros, como o glicogênio, ou diferentes, nos heteropolímeros, como os ácidos nucleicos. Os biopolímeros mais importantes são as proteínas, formadas por aminoácidos, os polissacarídios constituídos de monossacarídios e os ácidos nucleicos formados por nucleotídios. É muito comum a associação de macromoléculas para formar complexos como lipoproteínas, glicoproteínas, proteoglicanas e nucleoproteínas (ácidos nucleicos e proteínas).

A associação entre água e vida é bem conhecida, e toda célula é obviamente rica em água. A molécula de água é um dipolo, com uma extremidade eletricamente mais negativa (mais rica em elétrons) do que a outra. Por suas propriedades, as moléculas de água influem poderosamente nos processos metabólicos, tendo papel também na configuração espacial das macromoléculas e, portanto, na atividade funcional destas.

As proteínas têm papel enzimático e participam da estrutura e dos movimentos celulares. O papel dos ácidos nucleicos é principalmente informacional: constituem os genes e são responsáveis pela expressão da informação neles contida. Excepcionalmente, o RNA pode ter atividade enzimática. Os lipídios estão presentes em todas as membranas celulares, nas quais têm papel estrutural, e, como depósitos citoplasmáticos, representam também reserva nutritiva que é metabolizada para fornecer energia para a célula. Os polissacarídios em combinação com proteínas têm papel estrutural. Isoladamente, são encontrados sob a forma de amido, nas células vegetais, e de glicogênio, nas células animais, representando importante material energético.

Bibliografia

Armstrong, F.B.: *Biochemistry*, 3rd ed. Oxford Univ. Press, 1989.

Bolsover, S.R.: *Cell Biology. A Short Course*, 2nd ed. Wiley-Liss, 2003.

Doolittle, R.F.: Proteins. *Sci. Amer.*, **253** (4):88, 1985.

Gilbert, W.: The RNA world. *Nature*, 319:618, 1986.

Guerrier-Takada, C. and Altman, S.: Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vitro*. *Science*, 223:285, 1985.

Lehninger, A.L.: *Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function*, 2nd ed. Worth Pub., 1982.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M.: *Principles of Biochemistry*, 2nd ed. Worth Pub., 1993.

Mildvan, A.S.: Mechanism of enzyme action. *Ann. Rev. Biochem.*, 43:357, 1974.

Murray, R.K. *et al.*: *Harper's Biochemistry*, 24th ed. Appleton & Lange, 1996.

Perutz, M.: *Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy*. Freeman, 1992.

Schweigger, H.G. (ed.): *International Cell Biology*. Springer-Verlag, 1981.

Sigman, D.S. and Mooser, G.: Chemical studies of enzyme active sites. *Ann. Rev. Biochem.*, 44:889, 1975.

Stryer, L.: *Bioquímica*, 4ª ed. Guanabara Koogan, 1996.

Tanford, C.: The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*, **200**:1012, 1978.

Voet, D. and Voet, J.G.: *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley, 1995.

Zaug, A.J. and Cech, T.R.: The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science*, 231:470, 1986.

4 Papel das Mitocôndrias na Transformação e no Armazenamento de Energia

Roteiro

- Para realizar suas atividades, as células utilizam a energia contida nas ligações químicas dos nutrientes que, geralmente, é transferida para adenosina-trifosfato (ATP), o principal combustível celular; a enzima ATPase rompe a molécula de ATP, liberando energia e originando adenosina-difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi)
- A transferência de energia dos nutrientes para ATP também pode ser feita no citosol sem participação das mitocôndrias, pela fermentação (anaeróbia), mas esse processo retira apenas pequena parte da energia dos nutrientes
- As mitocôndrias têm a maquinaria para a fosforilação oxidativa (aeróbia), muito eficiente na transferência de energia dos nutrientes para ATP
- Teoria quimiosmótica admite que a energia dos nutrientes é utilizada para gerar um fluxo de prótons (H^+), cuja energia forma ATP a partir de ADP
- Cada mitocôndria contém um genoma constituído por filamentos circulares de DNA em hélice dupla, que codificam RNA e algumas, mas não todas, proteínas mitocondriais
- O genoma da mitocôndria é muito compacto; com exceção do local de origem da replicação, seu DNA é codificador em toda a sua extensão, sem sequências não codificadoras (não contém íntrons)
- Principalmente por falta de mecanismos de reparação do DNA, o genoma das mitocôndrias apresenta taxa de mutação muito alta, de 5 a 10 vezes maior do que a do DNA nuclear, que conta com processos reparadores muito eficientes
- O código genético do DNA das mitocôndrias é ligeiramente diferente do código que se admitia ser o mesmo, desde as bactérias até os humanos
- As mitocôndrias dos mamíferos são derivadas das mitocôndrias do óvulo e, portanto, de origem exclusivamente materna
- Os ribossomos das mitocôndrias são diferentes dos ribossomos do citosol e parecidos com os das bactérias
- Admite-se que, durante a evolução das células, as mitocôndrias se originaram de bactérias endossimbiontes (simbiontes intracelulares) que, no processo evolutivo, transferiram parte de seus genes para o núcleo da célula hospedeira.

A energia utilizada pelas células eucariontes para realizar suas atividades provém da ruptura gradual de ligações covalentes de moléculas de compostos orgânicos ricos em energia. Na célula vegetal (Capítulo 13), esses compostos são sintetizados com a energia resultante da transformação de energia solar em energia química durante o processo de fotossíntese (*photon*, luz, e *sintesis*, síntese). Na fotossíntese, graças principalmente ao pigmento clorofila, processa-se a acumulação da energia solar sob a forma de ligações químicas nos hidratos de carbono, principalmente hexoses, que se polimerizam para formar amido. As hexoses originadas na fotossíntese são fonte de energia e, também, de carbono em condições de ser utilizado para a síntese de diversas macromoléculas.

As células, porém, não usam diretamente a energia liberada dos hidratos de carbono e gorduras, mas se utilizam de um composto intermediário, a adenosina-trifosfato (ATP), geralmente produzido graças à energia contida nas moléculas de glicose e de ácidos graxos.

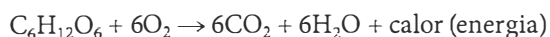
Nos animais, os ácidos graxos são, do ponto de vista quantitativo, uma fonte energética muito mais importante do que os carboidratos. Enquanto uma molécula-grama (mol) de glicose gera 38 mols (moléculas-grama) de ATP, uma de ácido palmítico gera 126 mols de ATP. Um homem adulto tem energia depositada em glicogênio suficiente apenas para um dia, mas gordura (ácidos graxos) suficiente para fornecer energia durante 1 mês. Quando o organismo está em repouso, as células usam mais glicose, proveniente do glicogênio, porém, durante o exercício físico, há mobilização dos ácidos graxos depositados nas gorduras.

O ATP (Figura 4.1) tem duas ligações ricas em energia (representadas pelo sinal ~); quando uma delas se rompe, libera aproximadamente 10 quilocalorias por mol. Geralmente, apenas uma ligação é rompida, segundo a equação ATP → ADP + Pi + energia (Pi significa fosfato inorgânico e ADP, adenosina-difosfato).

O citoplasma contém energia acumulada nos depósitos de moléculas de triacilglicerídios (gorduras neutras), de moléculas de glicogênio e, também, sob a forma de compostos intermediários (metabólitos) ricos em energia, dos quais o mais importante é o ATP, principal combustível das células. Os triacilglicerídios e o glicogênio representam acúmulo de energia sob forma estável e concentrada, mas dificilmente acessível, ao passo que o ATP é um composto instável, que não contém energia tão concentrada, mas facilmente utilizável porque a enzima que rompe a molécula de ATP (ATPase) é muito abundante na célula. A decomposição da glicose em água e gás carbônico, que ocorre durante a respiração celular, rende 690 kcal/mol, enquanto a hidrólise das duas ligações ricas em energia do ATP rende somente 20 kcal/mol. Glicogênio e gorduras podem ser comparados a dinheiro no banco, e ATP a dinheiro no bolso. De fato, o dinheiro depositado no banco é estável (teoricamente, não sujeito a roubo ou perdas) e pode ser acumulado em grandes somas. Já o dinheiro no bolso (ATP) é instável, só pode ser guardado em quantidades limitadas, mas é facilmente acessível quando necessário.

Figura 4.1 ▪ Fórmula do trifosfato de adenosina, abreviadamente chamado ATP. O símbolo ~ indica as ligações químicas que são muito ricas em energia.

A queima da glicose libera uma quantidade certa de energia e consome oxigênio. O resultado dessa operação, que pode ser realizada em um aparelho chamado calorímetro, produz calor (690 kcal/mol), água e gás carbônico, segundo a equação:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{calor (energia)}$$

Essa combustão da glicose é, porém, um processo abrupto, que leva o calorímetro rapidamente a altas temperaturas. Se isso ocorresse dentro de uma célula, ela se queimaria instantaneamente. Contudo, as células desenvolveram um sistema que oxida lentamente os nutrientes, liberando energia gradualmente, e produzindo água e CO_2. Esse processo, que consome O_2 e produz CO_2, chama-se respiração celular.

As células utilizam dois mecanismos para retirar energia dos nutrientes: a glicólise anaeróbia, que tem lugar no citosol, e a fosforilação oxidativa, que se realiza nas mitocôndrias.

A glicólise anaeróbia produz apenas 2 mols de ATP por cada mol de glicose

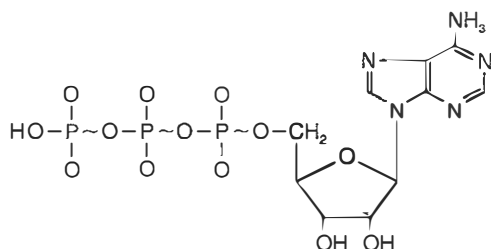
A glicólise anaeróbia é o processo pelo qual uma sequência de aproximadamente 11 enzimas do citosol promove transformações graduais em uma molécula de glicose, sem consumo de oxigênio, produzindo duas moléculas de piruvato e liberando energia que é armazenada em duas moléculas de ATP. O ATP se forma a partir do ADP e do fosfato inorgânico (Pi) existentes no citosol, segundo a equação:

$$2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} + \text{energia da glicose} \longrightarrow 2\ \text{ATP}$$

Nesse processo, a célula armazena 20 kcal para cada mol de glicose degradada. Essa degradação da glicose não necessita de oxigênio, razão pela qual é chamada de glicólise anaeróbia ou fermentação. No fungo levedo de cerveja, em condições anaeróbias, a glicólise prossegue, transformando-se o piruvato em etanol após uma série de reações enzimáticas. A fermentação fornece ao levedo de cerveja a energia necessária para sua manutenção e reprodução, sendo chamada fermentação alcoólica, porque o produto final é o álcool etílico.

A glicólise é um processo pouco eficiente, pois, das 690 kcal/mol presentes na glicose, apenas 20 kcal são aproveitadas e as células desenvolveram, ao longo da evolução, mecanismos mais eficazes para extração da energia dos nutrientes.

Graças à fosforilação oxidativa, cada mol de glicose produz mais 36 mols de ATP

Após o surgimento do oxigênio na atmosfera, desenvolveu-se uma nova via metabólica de maior rendimento energético do que a glicólise, a fosforilação oxidativa. De cada mol de

glicose, além dos 2 mols de ATP obtidos pela via anaeróbia, a fosforilação oxidativa produz mais 36 mols de ATP.

Na fosforilação oxidativa, o piruvato é oxidado até se formarem água e gás carbônico, com alto rendimento energético. Costuma-se distinguir, na oxidação fosforilativa, três mecanismos distintos, mas que se entrelaçam intimamente: a produção de acetilcoenzima A (acetil-CoA), o ciclo do ácido cítrico e o sistema transportador de elétrons.

Enquanto a glicólise é anaeróbia e tem lugar no citosol, a fosforilação oxidativa é aeróbia e se processa nas mitocôndrias (Figura 4.2).

Produção de acetilcoenzima A

A acetil-CoA é produzida a partir da coenzima A e de acetato originados do piruvato ou da β-oxidação dos ácidos graxos. Piruvato, derivado da glicólise, e ácidos graxos atravessam as membranas mitocondriais e, na matriz da organela, geram acetato, que se liga à coenzima A para formar acetil-CoA.

A transformação de piruvato em acetil-CoA deve-se a um sistema multienzimático da matriz mitocondrial, o complexo desidrogenase do piruvato, constituído de cópias múltiplas de três enzimas, cinco coenzimas e duas proteínas reguladoras. Esse complexo converte o piruvato em acetil-CoA, liberando CO_2, que é eliminado da mitocôndria. A acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico.

Enzimas presentes nas duas membranas mitocondriais transferem ácidos graxos para a matriz da mitocôndria, na qual eles são degradados por um ciclo de reações denominado β-oxidação dos ácidos graxos que remove dois átomos de carbono de cada vez, produzindo uma molécula de acetil-CoA em cada volta do ciclo. A acetil-CoA assim gerada também entra no ciclo do ácido cítrico, no qual a oxidação continua.

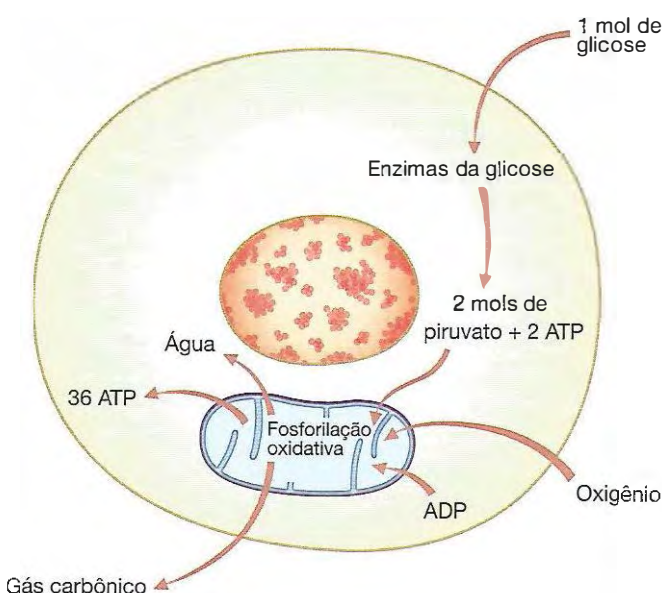



Figura 4.2 ▪ O desenho esquemático mostra que a glicólise ocorre no citosol, enquanto a produção de acetilcoenzima A e a oxidação fosforilativa se processam nas mitocôndrias. A maior produção de ATP ocorre na mitocôndria, em razão da oxidação dos substratos oriundos dos nutrientes, com consumo de oxigênio e formação de água e CO_2 (respiração aeróbia) contrastando com a glicólise (respiração anaeróbia), que não consome oxigênio e produz pouco ATP.

Ciclo do ácido cítrico

Esse ciclo, também chamado de ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos, é uma sequência cíclica de reações enzimáticas na qual ocorre, graças à presença das enzimas chamadas desidrogenases, a produção gradual de elétrons e prótons. Os elétrons são captados por moléculas complexas como o NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotídio), o FAD (flavina adenina dinucleotídio) e os citocromos, que funcionam como transportadores de elétrons, em um processo de oxidorredução. O hidrogênio, resultante das reações, é liberado na matriz mitocondrial, sob a forma de prótons (H^+).

O ciclo do ácido cítrico se origina com a condensação da acetil-CoA, proveniente de piruvato ou de ácidos graxos, com ácido oxalacético, produzindo ácido cítrico. Este sofre uma série de modificações e acaba produzindo ácido oxalacético, que, por sua vez, recomeça o ciclo.

O resultado final do ciclo do ácido cítrico é o seguinte: graças às desidrogenases, ocorre a produção de hidrogênio, que irá gerar prótons e elétrons. Descarboxilases levam à produção de CO_2, e no processo há uma reação exoenergética que promove a síntese de 2 mols de ATP por mol de glicose consumida (Figura 4.3). A função principal do ciclo do ácido cítrico é, portanto, produzir elétrons com alta energia e prótons, gerando CO_2; seu rendimento energético é baixo.

Além dessas funções, o ciclo do ácido cítrico fornece metabólitos que serão usados para a síntese de aminoácidos e hidratos de carbono.

Sistema transportador de elétrons

É uma cadeia, formada por enzimas e compostos não enzimáticos, cuja função é transportar elétrons. Dentre esses transportadores de elétrons estão os citocromos, compostos orgânicos ricos em ferro. Ao longo dessa cadeia, são transportados elétrons de alta energia que, gradualmente, cedem essa energia, que é veiculada para três lugares determinados da cadeia, em que ocorre a síntese de ATP. Esse processo é eficiente e produz 36 mols de ATP por mol de glicose consumida.

Há, ao longo da cadeia de oxidação fosforilativa, três locais nos quais a energia liberada pela oxidação é gradualmente transferida para o ATP graças à fosforilação do ADP. Nesses locais da cadeia, ocorre o acoplamento da liberação de energia, com o seu armazenamento por fosforilação. Existem moléculas tóxicas, como o dinitrofenol, que desacoplam essa transferência de energia, bloqueando a síntese de ATP e dissipando a energia sob a forma de calor.

Ao chegarem ao fim do sistema transportador, os elétrons ativam moléculas de oxigênio, produzindo O^- graças a um sistema enzimático, chamado citocromo-oxidase. Esse oxigênio com um elétron a mais combina-se com os prótons, produzindo água (Figura 4.3). A citocromo-oxidase é fortemente inibida pelo cianeto, razão pela qual esse composto é um tóxico muito forte.

Portanto, a respiração celular aeróbia produz CO_2, H_2O e energia (calor) segundo a equação global:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energia}$$

Como na mitocôndria o consumo de oxigênio está relacionado com a fosforilação de ADP, o processo recebeu o nome

de oxidação fosforilativa. O ADP é transferido do citosol para a mitocôndria, na qual é transformado em ATP, que passa para o citosol, no qual exercerá suas funções como combustível celular. Existe, portanto, um fluxo constante de ADP para dentro e ATP para fora da mitocôndria.

Do ponto de vista de rendimento energético, a mitocôndria é muito mais eficiente do que os motores construídos pelo homem. Calcula-se que, aproximadamente, a metade da energia liberada dos nutrientes é armazenada pelas mitocôndrias em moléculas de ATP; os outros 50% são dissipados sob forma de calor, que é utilizado para aquecer o corpo.

Frequentemente, as mitocôndrias situam-se em locais próximos aos que necessitam de energia (ATP)

As mitocôndrias (*mitos*, filamento, e *condria*, partícula) são organelas de forma arredondada ou alongada presentes no citoplasma das células eucariontes, que participam da respiração aeróbia e de diversas outras funções.

Essas organelas apresentam um diâmetro aproximado de 0,5 a 1,0 μm, variando o comprimento desde 0,5 até 10 μm. São mais numerosas nas células com metabolismo energético alto, como as células musculares estriadas. Em muitas células, as mitocôndrias se distribuem por todo o citoplasma, mudando constantemente de posição pela atividade das proteínas motoras do citoesqueleto. Contudo, em determinadas células elas se localizam próximo aos locais citoplasmáticos, onde existe grande consumo de energia. Nos epitélios ciliados, elas se acumulam perto dos cílios; nos espermatozoides, ao redor da porção inicial do flagelo, onde tem início a movimentação flagelar; e, nas células musculares estriadas, entre os feixes de miofibrilas (Figura 4.4). Outros exemplos são os acúmulos de mitocôndrias encontrados nas células sensoriais da retina (Figura 4.5) e nas células que transportam íons, como é o caso das células dos túbulos contorcidos renais (Figura 4.6).

A concentração de mitocôndrias nas células transportadoras de íons está associada a abundantes dobras da membrana plasmática, o que aumenta consideravelmente a área por onde tem lugar o transporte iônico. Nessas regiões, as membranas são ricas em ATPase, enzima que libera a energia que será utilizada pelas bombas iônicas aí presentes.

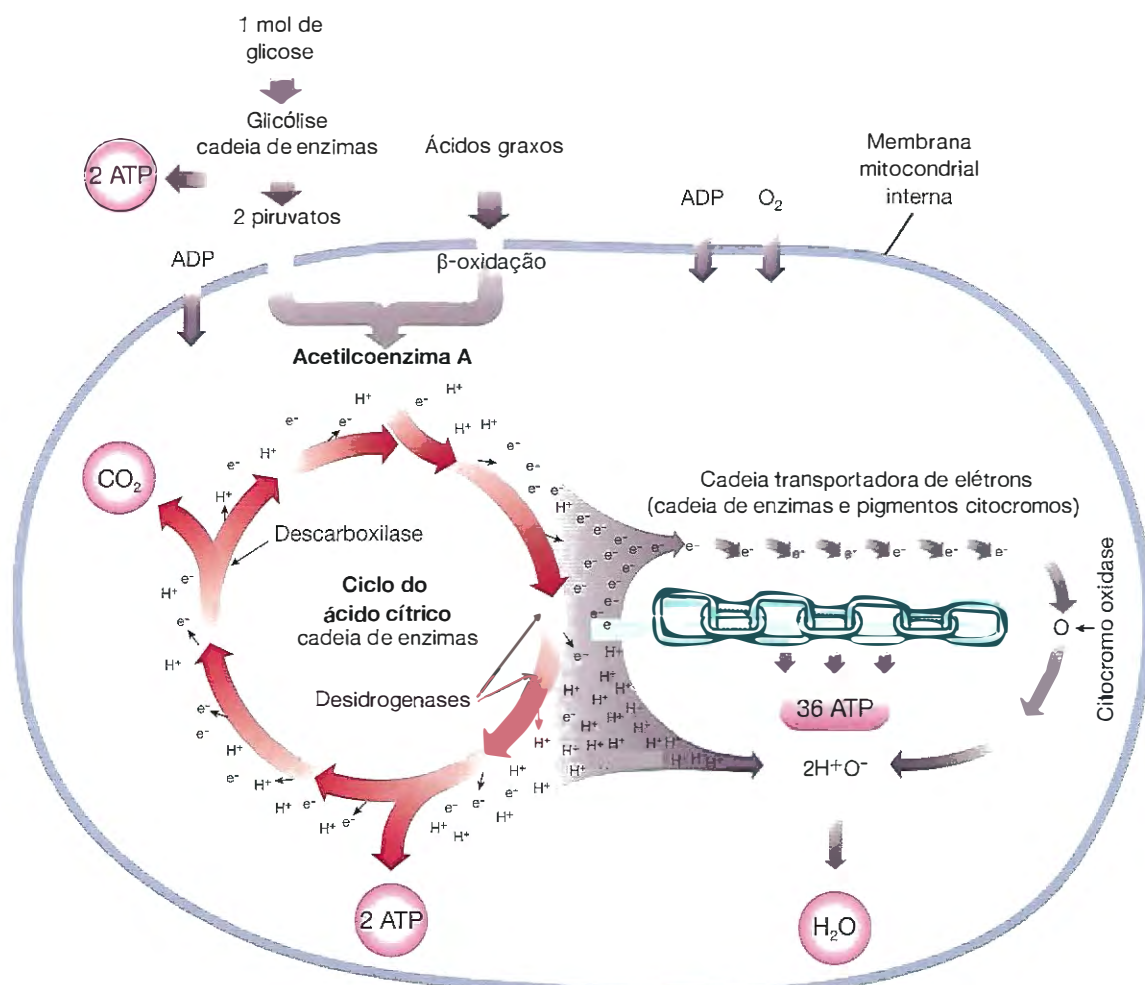



Figura 4.3 ▪ Ilustração dos principais processos que ocorrem na respiração celular aeróbia. A linha azul indica os limites de uma mitocôndria. Inicialmente, ocorre a produção de acetilcoenzima A, que entra no ciclo do ácido cítrico, do qual resulta a produção de elétrons, prótons, CO_2 e pequena quantidade de ATP. Os elétrons percorrem a cadeia transportadora de elétrons e produzem muito ATP. Os prótons combinam-se com o oxigênio, ativado pelo sistema citocromo-oxidase, produzindo água. Observe que, no citosol, 1 mol de glicose produz 2 mols de ATP, permanecendo muita energia nas moléculas de piruvato. Esse piruvato entra na mitocôndria, em que a energia restante do mol inicial de glicose é transferida para cerca de 38 mols de ATP. Portanto, a mitocôndria aumenta muito a capacidade celular de aproveitar a energia contida nos nutrientes. Observe, ainda, a entrada de oxigênio e ADP (adenosina-difosfato) na mitocôndria. O desenho não mostra, mas a mitocôndria necessita também de Pi (fosfato inorgânico) para que o ADP seja transformado em ATP.

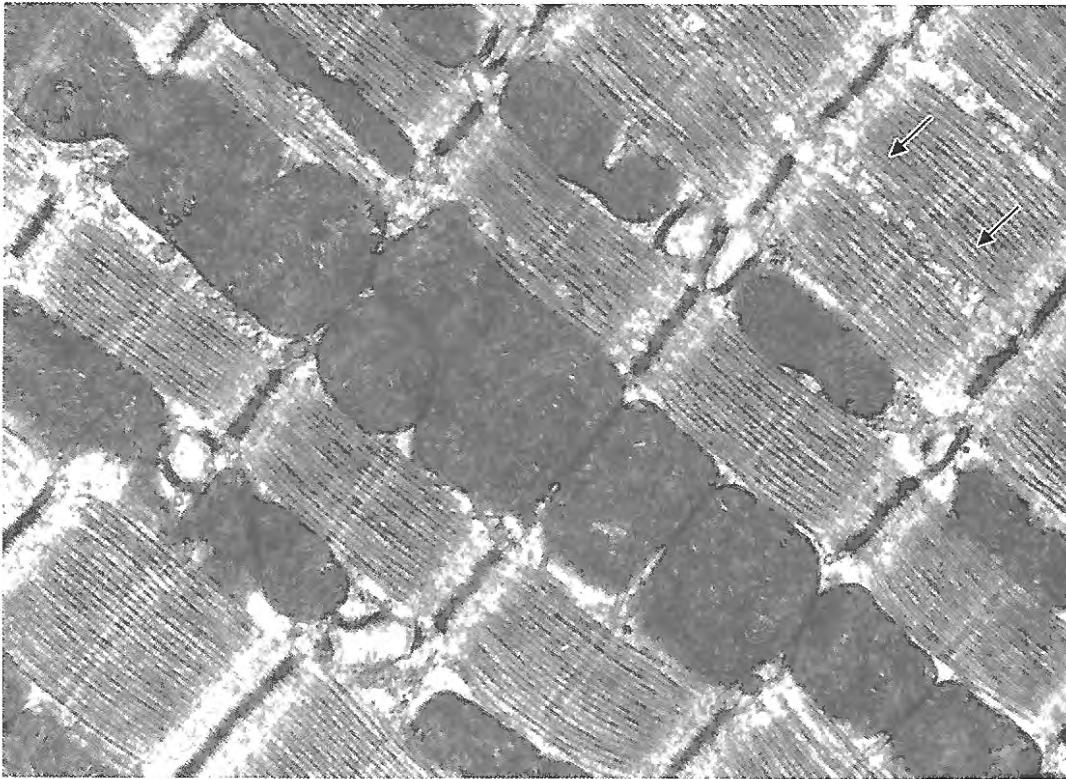



Figura 4.4 ▪ Eletromicrografia de músculo cardíaco, um tecido que necessita de muitas mitocôndrias, porque consome muito ATP, que é a fonte de energia para a contração muscular. Observe a disposição das mitocôndrias, formando um trajeto paralelo às miofibrilas. Note, também, que as mitocôndrias são ricas em cristas, e que a matriz mitocondrial é densa aos elétrons (aparece escura na micrografia). 30.000×.

Ultraestrutura e organização funcional das mitocôndrias

As mitocôndrias apresentam duas membranas que envolvem um espaço interno onde se localiza a matriz mitocondrial. As membranas mitocondriais, como as demais membranas celulares, são bicamadas de fosfolipídios, contendo pequenas quantidades de outros lipídios. A membrana mitocondrial externa é lisa e muito permeável a diversos tipos de moléculas com peso abaixo de 5 kDa (quilodáltons). Essa permeabilidade se deve à presença de proteínas intercaladas na membrana, as porinas, que formam canais com o diâmetro de 1 nm. Entre as duas membranas, observa-se o espaço intermembranoso.

Além das diferenças entre as proteínas das duas membranas, a membrana externa é rica em colesterol, enquanto a membrana interna é pobre nesse lipídio, sendo rica em cardiolipina, fosfo-

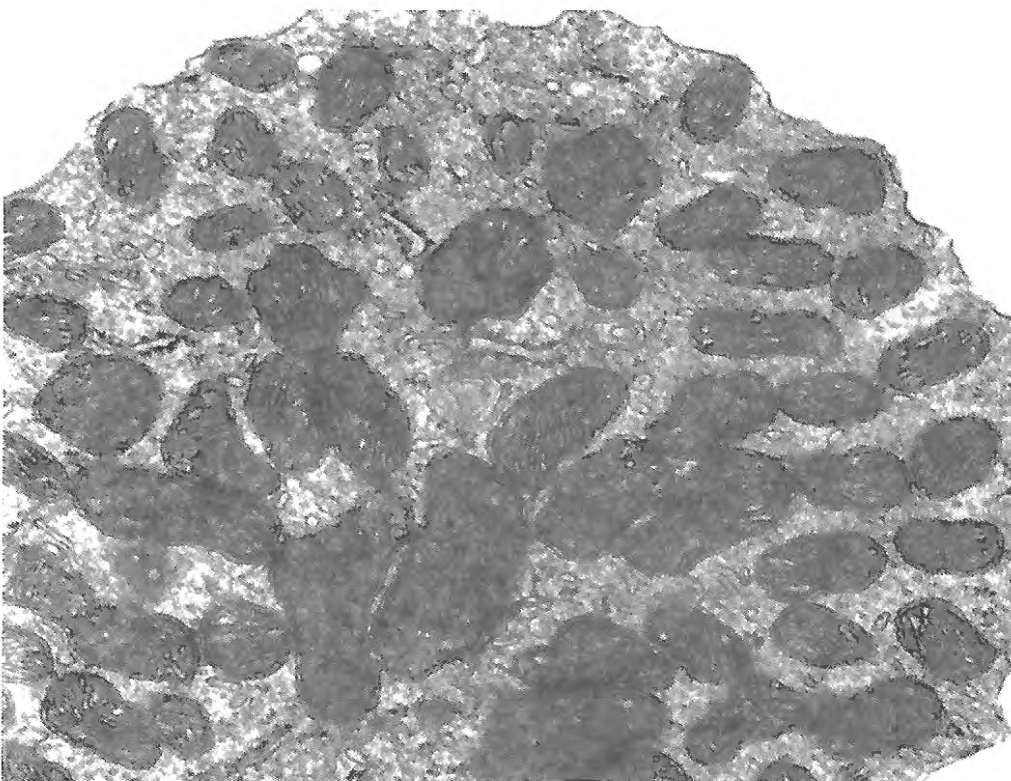



Figura 4.5 ▪ Eletromicrografia de célula da retina, em região onde ocorre um acúmulo de mitocôndrias. Observe que as mitocôndrias contêm muitas cristas e apresentam matriz densa aos elétrons (aparece escura na micrografia). 50.000×.

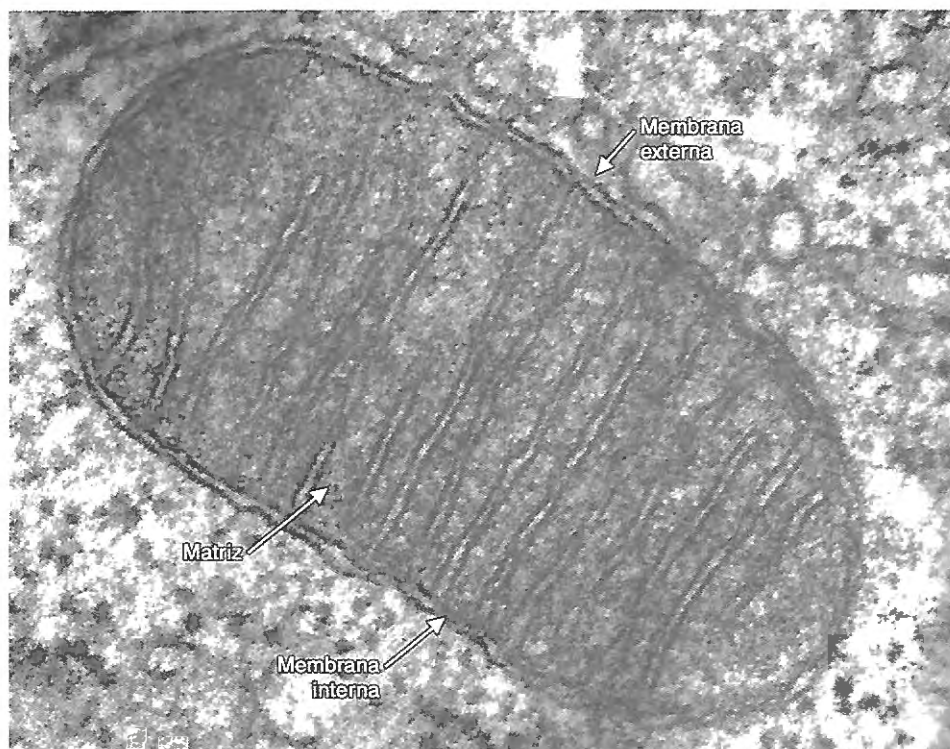



Figura 4.6 ▪ Eletromicrografia de mitocôndria de célula renal. Note a dupla membrana e as cristas, numerosas, mas menos frequentes do que no músculo estriado cardíaco (comparar com a Figura 4.4). A matriz, de aspecto granular, preenche o espaço entre as cristas. 84.000×.

lipídio com quatro ácidos graxos, que não existe na membrana externa. A cardiolipina contribui para dificultar a passagem de partículas com carga elétrica através da membrana mitocondrial interna, o que é funcionalmente importante, porque uma concentração elevada de íons, na matriz da mitocôndria, perturbaria o gradiente que gera o fluxo de prótons e a captação de energia no ATP, pelo processo quimiosmótico.

A constituição molecular das duas membranas das mitocôndrias está de acordo com a possível origem evolutiva dessas organelas a partir de bactérias simbiontes que se instalaram no citoplasma. A membrana mitocondrial externa é parecida com a membrana plasmática das células eucariontes e é muito sensível aos detergentes e ao ultrassom, propriedade que tem sido utilizada para romper a membrana externa e isolar, por centrifugação fracionada, as diversas partes das mitocôndrias, conforme será visto adiante. A membrana interna se assemelha muito à membrana das bactérias, e, como estas, contém o sistema de transferência de energia para ATP.

Os fosfolipídios das membranas mitocondriais não são sintetizados na organela, mas, sim, no retículo endoplasmático liso. As moléculas de fosfolipídios são transferidas para as mitocôndrias por proteínas transportadoras especiais, que carregam os lipídios de uma membrana muito rica nessas moléculas (retículo endoplasmático liso) para a membrana de organelas que estão com menor concentração lipídica. As mitocôndrias recebem fosfolipídios por processo semelhante ao descrito com relação aos peroxissomos. A diferença é que as mitocôndrias, embora incapazes de sintetizar fosfolipídios, exercem um papel funcionalmente significativo, modificando as moléculas recebidas pela via das proteínas transportadoras.

A membrana interna apresenta invaginações geralmente em forma de prateleiras, formando as cristas, que aumentam muito a superfície dessa membrana (Figuras 4.6 e 4.7). Em determinados protozoários e em células que sintetizam esteroides, as cristas podem ter a forma de tubos, o que leva ao aparecimento de estruturas circulares no interior das mitocôndrias, quando observadas em corte (Figura 4.8). Uma mesma mitocôndria pode apresentar cristas em prateleiras e cristas tubulares.

Na superfície da membrana interna que está voltada para o interior da mitocôndria, existem pequenas partículas em forma de raqueta (Figura 4.7), que se inserem pelos seus cabos nessa membrana. São os corpúsculos elementares, com cerca de 10 nm de diâmetro, onde se geram ATP e calor.

No interior das mitocôndrias, encontra-se uma substância finamente granular e elétron-densa (escura nas micrografias eletrônicas) chamada matriz. É frequente observar grânulos elétron-densos (grânulos densos) no seio da matriz, com diâmetro de 30 a 50 nm, contendo cálcio e de função pouco conhecida. A matriz mitocondrial contém filamentos de DNA, difíceis de visualizar no microscópio eletrônico, e ribossomos medindo 15 nm de diâmetro, portanto menores do que os do citosol e semelhantes aos das bactérias.

Existe alguma variação na estrutura mitocondrial, conforme o tipo de célula e seu estado funcional. De modo geral, a quantidade de cristas e a elétron-densidade são proporcionais à atividade respiratória da célula.

A análise da localização das enzimas, nos componentes das mitocôndrias, foi facilitada pela técnica de ruptura dessas organelas, com detergentes ou ultrassom, e pelo isolamento da membrana interna, da membrana externa, do conteúdo do espaço intermembranoso e do conteúdo da matriz (Figura 4.9).

Membrana externa
Contém enzimas de degradação dos lipídios a ácidos graxos. Permeável a moléculas de até 10.000 dáltons

DNA mitocondrial
Uma ou mais cadeias duplas contendo escasso número de genes

Espaço intermembranoso
Contém enzimas várias. Acumula prótons transportados da matriz

Crista mitocondrial
Dobras que aumentam a superfície da membrana interna e a eficiência na produção de ATP

Corpúsculos elementares
Fazem parte da membrana interna e contém complexo proteico com atividade de ATP-sintetase

Membrana interna
Impermeável, contém os componentes da cadeia de transporte de elétrons. Transporte transmembrana de prótons

Matriz mitocondrial
Contém enzimas que metabolizam piruvato e ácido graxo produzindo acetilcoenzima A, contém enzimas do ciclo do ácido cítrico, tRNA, mRNA e rRNA

Ribossomos mitocondriais
Contém RNA ribossômico. Participam da síntese proteica

Figura 4.7 ▪ O desenho esquemático apresenta um resumo dos principais componentes mitocondriais e suas funções.

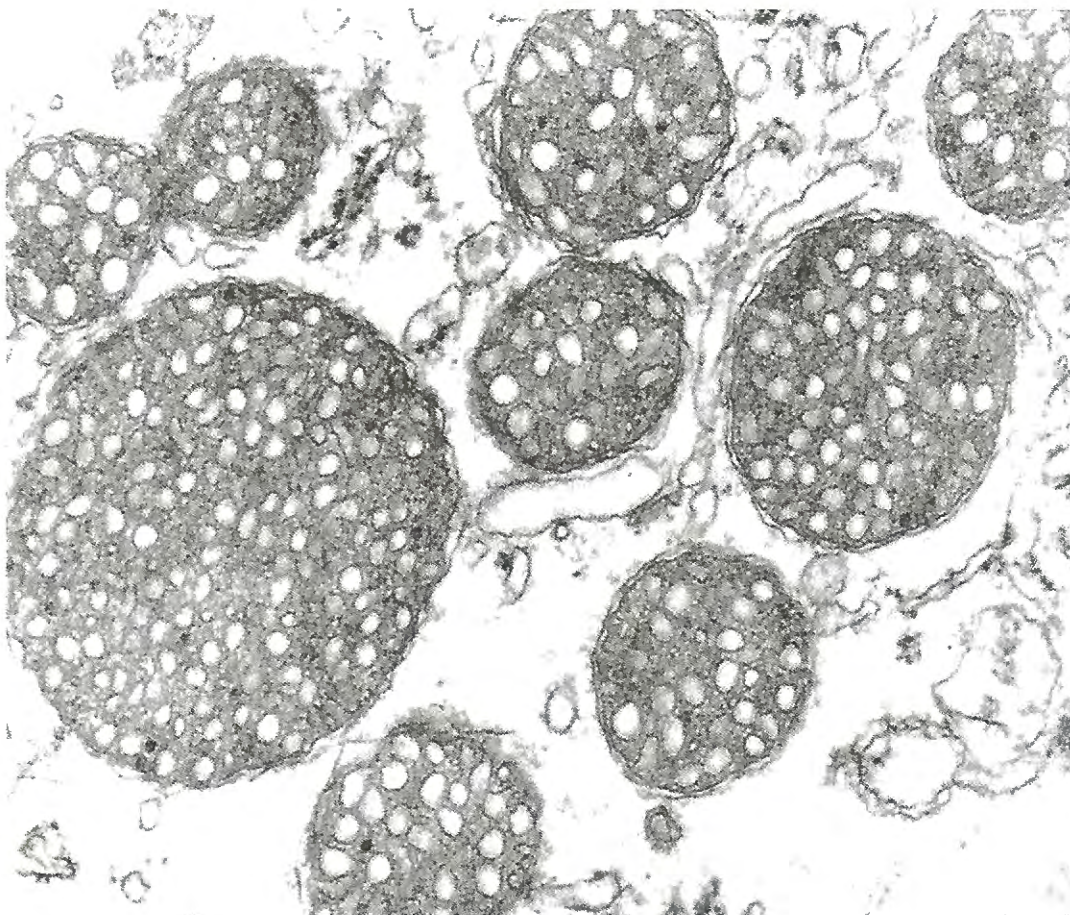



Figura 4.8 ▪ A eletromicrografia mostra parte do citoplasma de uma célula da camada cortical da glândula adrenal. Observe mitocôndrias contendo invaginações tubulosas de sua membrana interna, em vez de prateleiras. Essa disposição é frequente em células que sintetizam esteroides. 60.000×.

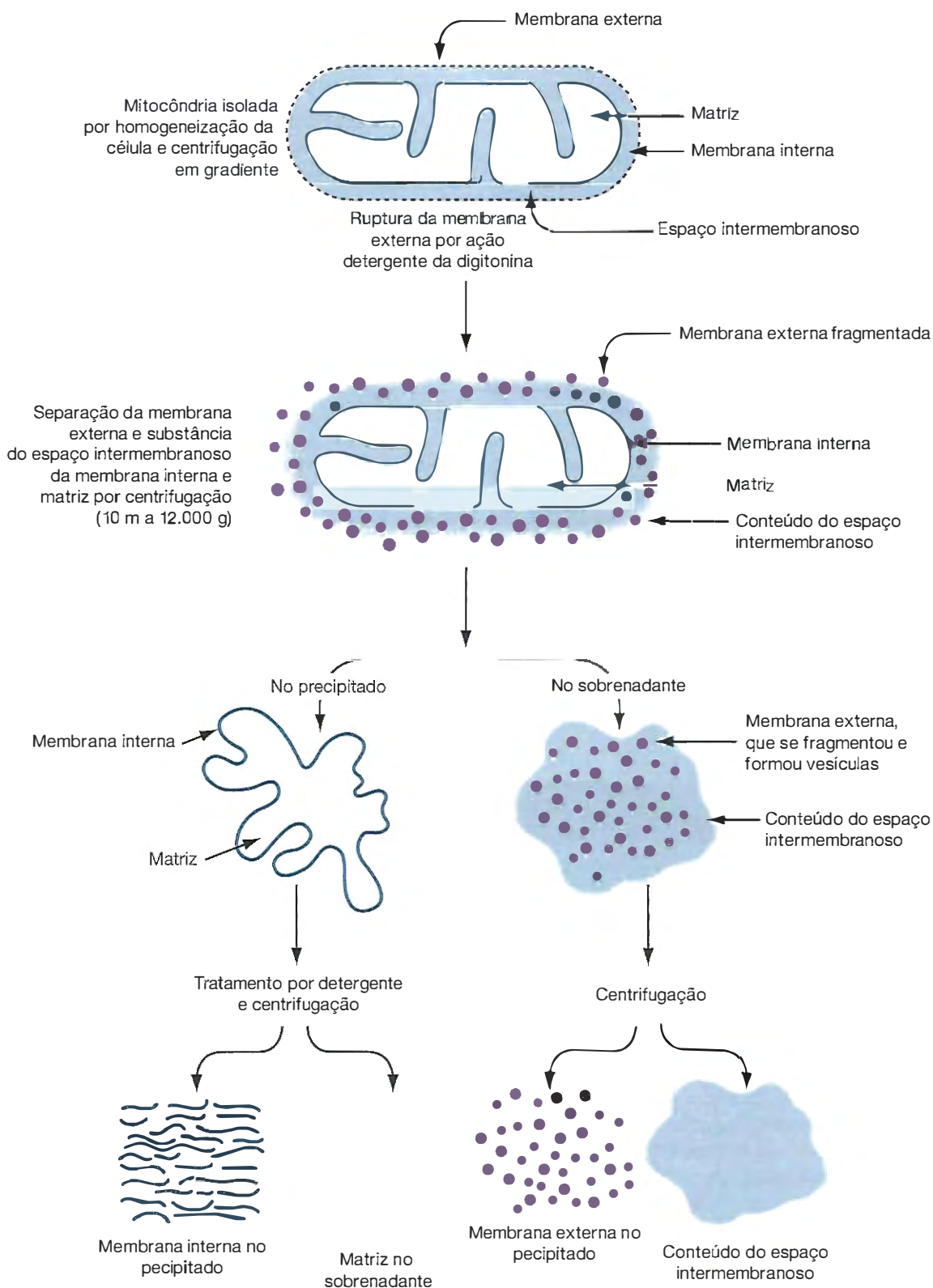



Figura 4.9 ▪ O esquema ilustra um dos métodos utilizados para fracionar as mitocôndrias. Esse fracionamento é possível porque a membrana mitocondrial externa é muito mais sensível a detergentes e ao ultrassom do que a interna. Essas membranas têm diferenças na constituição molecular. Além de outras diferenças, a membrana interna é rica em cardiolipina (como a membrana das bactérias) e não contém colesterol, enquanto a membrana externa não contém cardiolipina, mas sim colesterol, e pode ser rompida com mais facilidade. Cardiolipina é um fosfolipídio com quatro cadeias de ácidos graxos. A ilustração mostra que, na primeira etapa, apenas a membrana mitocondrial externa é rompida, conservando-se íntegra a membrana interna, que retém a matriz mitocondrial. Posteriormente, a ruptura da membrana interna, graças a novo tratamento com detergente, possibilita a obtenção dessa membrana e da matriz mitocondrial em frações separadas. O processo completo, como mostram os quatro desenhos de baixo, separa quatro frações: a membrana interna, a matriz, a membrana externa e o conteúdo do espaço intermembranoso.

O estudo dessas frações demonstrou que a matriz é um complexo concentrado de centenas de enzimas, entre as quais estão as relacionadas com o ciclo do ácido cítrico, com a β-oxidação de ácidos graxos e com a replicação, transcrição e tradução do DNA mitocondrial.

A membrana mitocondrial interna é a membrana celular mais rica em proteínas, compreendendo:

- enzimas e proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons
- proteínas dos corpúsculos elementares, com atividade de ATP-sintetase, sem a qual a membrana não teria a capacidade de acoplar o transporte de elétrons à síntese de ATP
- proteínas que fazem parte de múltiplos sistemas de transporte ativo.

Nas células procariontes (bactérias) não existem mitocôndrias, e a cadeia transportadora de elétrons encontra-se na face interna da membrana plasmática dessas células.

Além de seu papel na respiração celular, as mitocôndrias tomam parte em outros processos metabólicos importantes, como, por exemplo, a síntese de hormônios esteroides e o desencadeamento da apoptose. Esse processo de morte celular programada pode ser iniciado pela abertura de canais não específicos localizados na membrana interna da mitocôndria, com a passagem para o citosol de moléculas que iniciam a apoptose, como o citocromo c, o fator indutor da apoptose e caspases que são ativadas no citosol. Caspases são proteases promovedoras da apoptose (Capítulo 9).

A transferência de energia para ADP, transformando-o em ATP, deve-se a um processo quimiosmótico

Atualmente se admite que o acoplamento do processo oxidativo mitocondrial com a síntese de ATP a partir de ADP ocorre por um processo quimiosmótico. Os íons H^+ (prótons), produzidos no ciclo do ácido cítrico na matriz mitocondrial, são transportados ativamente através da membrana interna e acumulados no espaço intermembranoso, graças à energia liberada pelos elétrons, durante a sua passagem pela cadeia transportadora de elétrons. A energia do fluxo retrógrado de prótons, através dos corpúsculos elementares, é usada para transformar ADP em ATP. A Figura 4.10 ilustra a teoria quimiosmótica.

Em um tipo especializado de tecido adiposo, o tecido adiposo multilocular, as células são ricas em mitocôndrias. Essas células são especializadas na produção de calor para defesa contra o frio e para acordar os animais hibernantes. A produção de calor é muito aumentada nas células desse tecido porque a membrana interna de suas mitocôndrias apresenta muitas moléculas de termogenina (*termo*, calor, e *gene*, gerar). Essa proteína permite que os prótons, acumulados no espaço intermembranoso, fluam livremente de volta para a matriz, sem passar pelos corpúsculos elementares. Consequentemente, não ocorre síntese de ATP e a energia derivada do fluxo de prótons é dissipada sob a forma de calor (Figura 4.10).

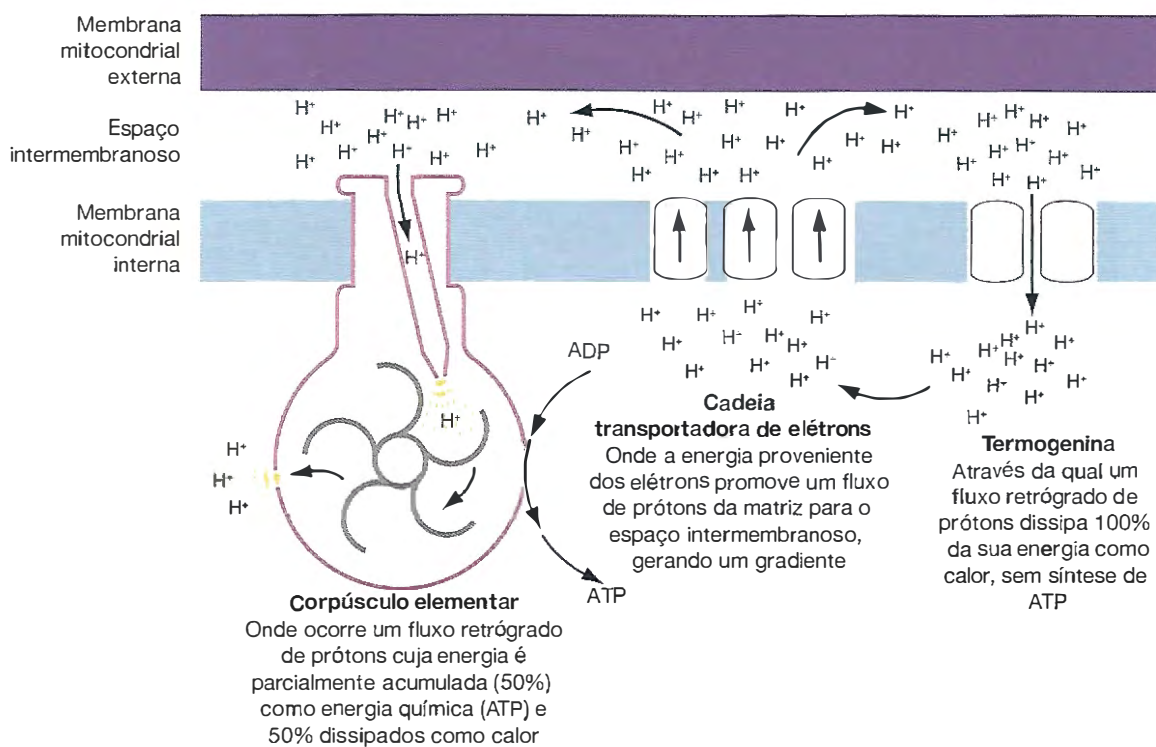



Figura 4.10 ▪ O esquema ilustra os mecanismos pelos quais a mitocôndria retira energia dos nutrientes, acumulando-a sob a forma de energia química facilmente disponível no ATP. Parte da energia dos nutrientes é, normalmente, dissipada sob a forma de calor. A proteína termogenina pode funcionar como uma espécie de válvula, regulando a quantidade de energia dos nutrientes que irá gerar calor. A termogenina tem papel significativo no despertar dos animais que hibernam, aquecendo o sangue desses animais. O dinitrofenol, substância que inibe a oxidação fosforilativa, é um composto anfipático (prende-se por uma extremidade a uma região hidrofóbica e, pela outra, a uma região hidrofílica) que desorganiza a estrutura da membrana mitocondrial interna, promovendo um fluxo retrógrado de prótons, sem síntese de ATP.

As mitocôndrias apresentam um genoma próprio, embora incompleto

Novas organelas são produzidas continuamente na célula para atender ao crescimento e à multiplicação das células e, também, para substituir as organelas desgastadas pelo uso. Algumas organelas se formam *de novo*, como os lisossomos, que brotam das cisternas do aparelho de Golgi. Mas as mitocôndrias (e os cloroplastos) se originam pelo crescimento e divisão das mitocôndrias preexistentes. Essas organelas contêm DNA, três tipos de RNA (rRNA, mRNA e tRNA) e todo o sistema molecular necessário para a síntese de algumas proteínas. O DNA das mitocôndrias, como o DNA das bactérias, codifica mRNA formados apenas por éxons, sem íntrons.

O genoma das mitocôndrias humanas, que é relativamente pequeno, tem 16.569 nucleotídios, formando 2 genes para rRNA, 22 para tRNA e 13 genes que codificam mRNA para a síntese de proteínas, em um total de 37 genes. No genoma mitocondrial, 4 dos 64 códons apresentam significados diferentes do código genético universal.

Uma peculiaridade do DNA mitocondrial é sua origem exclusivamente materna. As mitocôndrias do organismo se originam das mitocôndrias do óvulo, sem participação das mitocôndrias do espermatozoide.

O DNA das mitocôndrias se apresenta em várias cópias, sob a forma de anéis de cadeia dupla, com uma circunferência de 5 a 6 μm (Figura 4.11). Esse DNA, que se replica independentemente do DNA nuclear, especifica a sequência de aminoácidos de algumas – mas não de todas – as proteínas mitocondriais, além de codificar os três tipos de RNA (Figura 4.12).

A maior parte das proteínas mitocondriais é sintetizada no citosol, em polirribossomos livres, e daí transferida para as mitocôndrias. As proteínas destinadas às mitocôndrias têm um pequeno segmento da molécula que é um sinal de endereçamento para essa organela. O processo de importação mitocondrial de proteínas é regulado por proteínas citosólicas, do grupo das moléculas chaperonas. As proteínas destinadas à matriz mitocondrial são mantidas distendidas pela ação da molécula chaperona hsp 70, utilizando energia de ATP. Esse primeiro passo é necessário porque moléculas proteicas dobradas não penetram nas mitocôndrias. O complexo constituído pela proteína mais a chaperona é reconhecido e se prende a receptores da membrana mitocondrial externa, sendo movido para locais em que a membrana mitocondrial externa e a interna se tocam (locais de contato). Nesses locais, a proteína é transferida para o interior das mitocôndrias, com utilização da energia do potencial elétrico entre as membranas e a matriz da mitocôndria. Na mitocôndria, outras chaperonas, usando energia de ATP, fazem com que a proteína se dobre, assumindo sua conformação ativa, e o sinal de endereçamento é removido pela ação de proteases (Figura 4.13).

Figura 4.12 ▪ O esquema mostra que as mitocôndrias têm um sistema genético próprio, porém modesto, que gera proteínas relacionadas com a replicação do seu DNA e algumas proteínas da sua membrana interna. A maioria das outras proteínas mitocondriais (das membranas, da matriz e dos ribossomos) têm origem nos polirribossomos citoplasmáticos. Essas proteínas são sintetizadas com uma pequena sequência de aminoácidos, ou sinal de endereçamento, ligam-se a moléculas chaperonas, sendo o complexo reconhecido por receptores da superfície mitocondrial. Em seguida, as proteínas são introduzidas na mitocôndria, consumindo energia dos prótons do espaço intermembranoso.

Figura 4.11 ▪ Eletromicrografias de moléculas circulares de DNA, isoladas de mitocôndrias de fibroblastos de camundongo. *Em cima*, 50.000× e, *embaixo*, 40.000×. (Cortesia de M.M.K. Nass.)

Figura 4.13 ▪ Ilustração da molécula proteica produzida no citosol, porém destinada à matriz mitocondrial. A proteína recém-sintetizada, que tem uma pequena sequência de aminoácidos como sinal de sua destinação, mantém-se distendida pela combinação temporária com a chaperona hsp 70. O sinal é reconhecido por um receptor localizado na membrana mitocondrial externa e é transferido, com gasto de energia, para o interior da mitocôndria por um canal que atravessa as duas membranas mitocondriais. Dentro da organela, a proteína se dobra para assumir sua forma definitiva, com o auxílio de outra chaperona (hsp 60). Em seguida, a sequência sinal é removida por protease da matriz mitocondrial.

Origem das mitocôndrias

A existência de DNA, dos vários tipos de RNA e de um mecanismo de autorreprodução por fissão semelhante ao das bactérias, além de outros dados, sugere que as mitocôndrias se originaram de bactérias aeróbias, que estabeleceram relação simbiótica com células eucariontes anaeróbias (Capítulo 1). Os ribossomos das mitocôndrias são semelhantes aos das bactérias, o mesmo acontecendo com o DNA, que, tanto nas mitocôndrias como nas bactérias, codifica mRNA sem íntrons. Os ribossomos mitocondriais são diferentes dos citosólicos, no tamanho, na composição em RNA e proteínas e, também, na sensibilidade aos antibióticos. A ciclo-heximida, por exemplo, inibe a síntese proteica nos ribossomos citosólicos, mas não a síntese de proteínas nos ribossomos das mitocôndrias.

O cloranfenicol, ao contrário, inibe a síntese de proteínas tanto nas mitocôndrias (Figura 4.14) como nas bactérias, mas não nos ribossomos do citosol, sendo um antibiótico usado na prática médica.

Durante a evolução, bactérias teriam penetrado por fagocitose em células eucariontes primordiais, tendo escapado aos mecanismos intracelulares de destruição de células estranhas e estabelecido a endossimbiose (simbiose endocelular). Pela fagocitose, a membrana plasmática da célula eucarionte hospedeira provavelmente originou a membrana externa da mitocôndria e a membrana da bactéria se tornou a membrana interna dessa organela. De fato, a membrana externa das mitocôndrias é muito semelhante à membrana plasmática das células eucariontes, enquanto a membrana interna tem constituição molecular parecida com a das membranas das bactérias.

Essa endossimbiose ofereceu vantagens tanto para a bactéria aeróbia, que recebeu proteção e nutrientes, como para a célula hospedeira anaeróbia, que ganhou um sistema mais eficiente de aproveitamento de energia pela fosforilação oxidativa, evoluindo para uma célula eucarionte aeróbia. Como a concentração de oxigênio estava aumentando na atmosfera pela atividade das células fotossintéticas, a mencionada endossimbiose teve ainda a vantagem de oferecer um mecanismo pelo qual a célula hospedeira não somente se tornou energeticamente mais eficiente, como, ao mesmo tempo, adquiriu um mecanismo para se livrar do excesso de oxigênio, cujo acúmulo no meio intracelular pode danificar as macromoléculas por oxidação.

Admite-se que, ao longo do processo evolutivo, as mitocôndrias gradualmente perderam a maior parte do seu genoma,

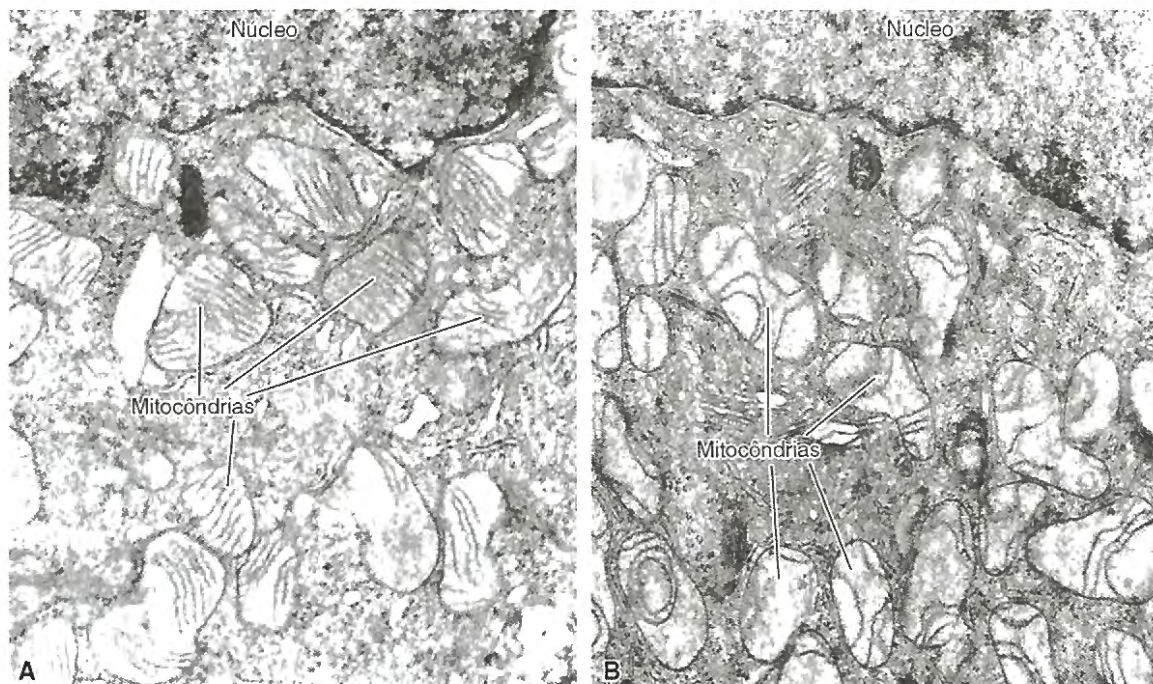



Figura 4.14 ▪ Eletromicrografias de células HeLa cultivadas *in vitro*. Em **A**, célula-controle e, em **B**, após adição, ao meio de cultura, de 50 mg/mℓ de cloranfenicol. Esse antibiótico inibe a síntese proteica nos ribossomos das bactérias (células procariontes) e das mitocôndrias. Observe, na eletromicrografia **B**, que o antibiótico provocou uma diminuição na quantidade de cristas das mitocôndrias. **A**, aumento 15.000×. **B**, aumento 22.000×. (Cortesia de R. Lank e S. Penman. *J. Cell. Biol.*, *49*:541, 1971. Reprodução autorizada.)

que foi transferido para o núcleo da célula hospedeira, e tornaram-se dependentes de proteínas codificadas pelo genoma do núcleo celular.

Existem doenças decorrentes de defeitos no DNA mitocondrial

Existem doenças raras que são devidas a mutações no DNA das mitocôndrias. Na **doença de Luft**, há aumento na quantidade de mitocôndrias no tecido muscular esquelético, e também aumento do metabolismo basal do doente. Essa condição pode simular hipertireoidismo. Nesses doentes, a oxidação fosforilativa está parcialmente desacoplada, formando-se pouco ATP e mais calor. Já a miopatia mitocondrial infantil, doença fatal, acompanhada de lesão nos músculos esqueléticos e disfunção renal (as células musculares e renais consomem muita energia e são ricas em mitocôndrias), é resultante da diminuição acentuada, ou mesmo ausência completa, das enzimas da cadeia transportadora de elétrons.

Tanto homens como mulheres podem apresentar doenças por defeito no DNA mitocondrial, mas somente as mulheres transmitem para os descendentes, porque as mitocôndrias são herdadas dos óvulos, e não dos espermatozoides. As mitocôndrias do óvulo fecundado (zigoto) e das células dele originadas são derivadas da multiplicação das mitocôndrias do óvulo e, portanto, maternas.

A herança mitocondrial apresenta outras particularidades que serão mencionadas brevemente, uma vez que seu estudo está além dos limites deste livro. Cada mitocôndria tem diversas cópias do seu DNA (como acontece com as bactérias), e cada óvulo contém milhares de mitocôndrias que são as precursoras de todas as mitocôndrias do organismo adulto. Essas cópias de DNA podem ter sofrido diferentes mutações, não sendo todas iguais. Nas divisões celulares durante o desenvolvimento embrionário, a distribuição das mitocôndrias originadas por divisão das preexistentes se faz de modo irregular entre as novas células. Por isso, doenças mitocondriais só aparecem quando determinado tecido ou órgão apresenta preponderância de mitocôndrias com DNA defeituoso. Isso acontece ao acaso e explica a grande variabilidade na gravidade dos sintomas apresentados pelos membros de uma família que apresenta a mesma mutação no DNA mitocondrial.

Deve ser observado, ainda, que o genoma mitocondrial não conta com mecanismos de correção do DNA acidentalmente alterado e, por isso, o número de mutações no DNA mitocondrial é pelo menos 10 vezes maior do que no DNA do núcleo celular. Por esse motivo, a presença de múltiplas cópias de DNA no genoma mitocondrial representa uma vantagem porque a mutação numa cópia pode não gerar sintomas, em razão da atividade das cópias normais.

O estudo das doenças causadas por defeitos nas mitocôndrias é dificultado, ainda mais, pelo fato de que a maioria das proteínas das mitocôndrias é codificada por genes nucleares, de modo que uma doença hereditária mitocondrial pode ser devida a mutação no DNA das mitocôndrias, no DNA da cromatina nuclear, ou a mutação em ambos, o que torna muito complexa a elucidação da hereditariedade dessas doenças, que comprometem principalmente os tecidos que utilizam grande quantidade de energia, necessitando de muito ATP, como é o caso dos músculos estriados, das células dos túbulos renais e das glândulas.

Resumo

Para a realização de suas atividades, as células usam a energia obtida por meio da ruptura das ligações covalentes das moléculas dos nutrientes. As células das plantas e de raras bactérias são autotróficas, sintetizando moléculas alimentares complexas, a partir de moléculas inorgânicas e da energia solar. As demais células são heterotróficas. Estas não são capazes de converter em ligações químicas a energia do sol, não sintetizam moléculas alimentares e, portanto, dependem

inteiramente do alimento sintetizado pelas células autotróficas para sua sobrevivência.

Nas células, a energia dos nutrientes é liberada gradativamente e parcialmente transferida para as moléculas de ATP (adenosina-trifosfato), que contêm ligações ricas em energia. Outra parte é dissipada sob a forma de calor, indo aquecer o organismo.

As moléculas energéticas mais usadas pelas células são os ácidos graxos e a glicose. Esta é degradada na matriz citoplasmática, sem participação de oxigênio, pelo processo de glicólise anaeróbia, e cada mol de glicose produz 2 mols de ATP e deixa como resíduo 2 mols de piruvato, que ainda contêm muita energia. Moléculas de piruvato e de ADP passam para a matriz mitocondrial, onde também chega oxigênio da respiração e se forma acetilcoenzima A, que entra no ciclo do ácido cítrico. Este e o sistema transportador de elétrons produzem mais 36 mols de ATP. Do ponto de vista do aproveitamento de energia, a vantagem da mitocôndria é enorme. Sem ela, a célula obteria apenas 2 mols de ATP por mol de glicose. Com a mitocôndria, o rendimento é muito maior.

As mitocôndrias são organelas arredondadas ou alongadas localizadas, geralmente, próximo às regiões do citoplasma que necessitam de muita energia. São constituídas por duas membranas. A externa é lisa e muito permeável. A membrana interna contém cardiolipina, é seletiva, controla melhor o trânsito molecular nos dois sentidos e se dobra formando pregas para o interior da mitocôndria. Essas dobras aumentam muito a superfície da membrana interna, criando mais área para o sistema transportador de elétrons que aí se localiza. O interior da organela, limitado pela membrana interna, contém a matriz mitocondrial, onde estão as enzimas do ciclo do ácido cítrico, além de outras enzimas, DNA e os vários tipos de RNA.

A energia liberada na cadeia transportadora de elétrons é utilizada para o transporte de prótons da matriz para o espaço intermembranoso, onde os prótons se acumulam. Esses prótons do espaço intermembranoso fluem de volta para a matriz, através dos corpúsculos elementares, fluxo esse cuja energia é convertida, no corpúsculo elementar, em energia química facilmente acessível, graças à síntese do ATP a partir do ADP.

As mitocôndrias sintetizam algumas proteínas próprias, mas a maior parte das proteínas mitocondriais é sintetizada no citoplasma, sob o controle do código genético do núcleo celular, sendo, depois, transferida para a mitocôndria por um processo seletivo.

Bibliografia

Alberts, B. *et al.*: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. Garland Press, New York, 1994.

Garlid, K.D.: Physiology of mitochondria. *In:* Sperelakis, N.: *Cell Physiology Source Book*, 2nd ed., p. 111. Academic Press, 1998.

Hatefi, Y.: The mitochondrial electron transport oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**:1015, 1985.

Hinckle, P.C. and McCarty, R.E.: How cells make ATP. *Sci. Amer.*, **283**:104, 1978.

Tzagoloff, A.: *Mitochondria*. Plenum Press, New York, 1982.

Wallace, D.C.: Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Amer.*, 277(2):22, 1997.

Wallace, D.C.: Mitochondrial disease in man and mouse. *Science*, 283:1482, 1999.

5 Membrana Plasmática

Roteiro

- A membrana plasmática mantém constante o meio intracelular, tem receptores para hormônios e outros sinais químicos, e estabelece conexões das células umas com as outras e com a matriz extracelular
- Todas as membranas celulares são constituídas por uma bicamada fluida de fosfolipídios, onde estão inseridas moléculas de proteínas que podem ser deslocadas, no plano da membrana, por atividade do citoesqueleto
- Conforme a maior ou menor facilidade de extração, distinguem-se as proteínas periféricas e as integrais da membrana
- As moléculas de fosfolipídios e de proteínas estão dispostas nas membranas de modo assimétrico: uma face da membrana é diferente da outra
- A superfície externa da membrana plasmática é rica em moléculas proteicas e lipídicas contendo glicídios. Estes glicídios fazem parte do glicocálice
- Os fibronexos, constituídos por diversas moléculas proteicas, estabelecem conexão entre o citoesqueleto e moléculas da matriz extracelular
- As moléculas podem penetrar nas células ou delas sair por transporte passivo, transporte ativo, difusão facilitada ou transporte impulsionado por gradiente iônico
- Os microvilos, interdigitações e estereocílios aumentam a superfície celular
- As CAM são glicoproteínas integrais da membrana que possibilitam a adesão entre as células; algumas CAM perdem a adesividade quando a concentração de Ca^{2+} é muito baixa
- As membranas plasmáticas formam estruturas de adesão (desmossomo e junção aderente), de vedação do espaço intercelular (zônula oclusiva) e de comunicação entre as células (junção comunicante).

A membrana plasmática ou celular separa o meio intracelular do extracelular e é a principal responsável pelo controle da penetração e saída de substâncias da célula.

Por sua diminuta espessura, a membrana plasmática não é visível no microscópio óptico (microsópio de luz), só podendo ser vista no microscópio eletrônico. Todavia, sua existência já era conhecida antes do microscópio eletrônico graças ao emprego de técnicas indiretas. A observação de que o volume das células se altera de acordo com a concentração das soluções em que são colocadas (Figura 5.1) foi um dos primeiros indícios da existência da membrana celular.

A membrana plasmática participa de numerosas funções celulares. É responsável pela manutenção da constância do meio intracelular, que é diferente do meio extracelular. Para que as células funcionem, cresçam e se multipliquem, é necessário que as substâncias adequadas sejam selecionadas e transferidas para dentro da célula e as substâncias desnecessárias sejam impedidas de penetrar ou, então, eliminadas do citoplasma.

Graças a seus receptores específicos, a membrana tem a capacidade de reconhecer outras células e diversos tipos de moléculas, como, por exemplo, hormônios. Este reconhecimento, pela ligação de uma molécula específica (sinal químico ou ligante) com o receptor da membrana, desencadeia uma resposta que varia conforme a célula e o estímulo recebido. A resposta pode ser contração ou movimento celular, inibição ou estimulação da secreção, síntese de anticorpos, proliferação mitótica etc.

Por meio de suas membranas, determinadas células se prendem firmemente umas às outras, formando muitas vezes camadas que delimitam compartimentos diferentes. Um exemplo é a camada epitelial que recobre internamente o trato digestivo e constitui uma barreira com permeabilidade seletiva, situada entre o meio externo (conteúdo do tubo digestivo) e o meio interno (sangue, linfa, matriz extracelular dos tecidos).

Em diversos tecidos, as membranas de células contíguas podem estabelecer canais de comunicação entre si, por onde têm lugar trocas de moléculas e íons que participam da coordenação das atividades desses agrupamentos celulares. Em muitos tecidos, as membranas celulares apresentam moléculas que se ligam a componentes da matriz extracelular, participando assim tanto da fixação da célula em determinados locais (ligações estáveis), como servindo de apoio para a migração celular (ligações instáveis) no interior do tecido.

Além da membrana plasmática, que será estudada neste capítulo, as células eucariontes contam com um elaborado sistema de membranas (p. ex.: envoltório nuclear, retículo endoplasmático, mitocôndrias, cloroplastos, aparelho de Golgi) que divide a célula em compartimentos. As mitocôndrias e cloroplastos são subdivididos internamente por membranas, ampliando ainda mais a compartimentalização intracelular. Assim, a célula executa, em separado e com mais eficiência, funções especializadas que não poderiam ser realizadas em um único compartimento.

Por outro lado, muitos sistemas enzimáticos encontram-se presos às membranas, o que possibilita uma ordenação sequencial da atividade de cada enzima, aumentando a eficiência do sistema. As moléculas enzimáticas fixam-se às membranas em uma sequência tal que o produto de uma enzima é processado pela enzima ao lado, e assim sucessivamente, até a obtenção do produto final da cadeia enzimática. Um exemplo é a cadeia transportadora de elétrons, cujos componentes (enzimas e transportadores) estão localizados na membrana interna das mitocôndrias e na face interna da membrana celular das bactérias.

Graças ao isolamento de membranas (Figura 5.2), descobriu-se que a membrana plasmática e as demais membranas celulares são constituídas principalmente de lipídios, proteínas e hidratos de carbono ligados aos lipídios e proteínas, mas a proporção desses componentes varia muito, conforme o tipo de membrana. Por exemplo, as membranas de mielina que recobrem as fibras nervosas e têm o papel de isolante elétrico, contêm 80% de lipídios, enquanto as membranas mitocondriais internas, metabolicamente muito ativas, contêm apenas 25% de lipídios, apresentando uma predominância das proteínas responsáveis pelo alto metabolismo dessas membranas.

Figura 5.1 ▪ Modificações do volume celular conforme a concentração do meio. *Em cima*, células vegetais em meio isotônico e em meio hipertônico, que provoca uma plasmólise. Voltando ao meio isotônico, a célula readquire sua forma inicial (desplasmólise). *Embaixo*, eritrócitos em meio isotônico (NaCl 0,9%), em meio hipertônico (NaCl 1,5%) e em meio hipotônico (NaCl 0,6 e 0,4%). Em meio fortemente hipotônico, o eritrócito se rompe (hemólise).

▪ Lipídios das membranas

Os lipídios das membranas são moléculas longas com uma extremidade hidrofílica e uma cadeia hidrofóbica. As macromoléculas que apresentam esta característica de apresentarem uma região hidrofílica e, portanto,

Figura 5.2 ▪ Por serem desprovidos de organelas, os eritrócitos são um material adequado para o isolamento da membrana plasmática. Colocados em meio hipotônico, os eritrócitos se rompem, havendo perda da hemoglobina. Por centrifugação, podem-se obter as membranas isoladas.

solúvel em meio aquoso e uma região hidrofóbica, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios, são ditas anfipáticas. Entre os lipídios frequentes nas membranas celulares encontram-se fosfoglicerídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidiltreonina), esfingolipídios e colesterol. Os fosfoglicerídios e os esfingolipídios contêm o radical fosfato e são chamados fosfolipídios. Outro constituinte anfipático importante das membranas celulares são os glicolipídios, designação genérica para todos os lipídios que contêm hidratos de carbono, com ou sem radicais fosfato. Os glicolipídios mais abundantes nas células dos animais são os glicoesfingolipídios, que são componentes de muitos receptores da superfície celular. Os hidratos de carbono dos glicoesfingolipídios são, em geral, moléculas com seis átomos de carbono (hexoses), como a glicose, manose, fucose e galactose. Esses açúcares, associados em diferentes proporções, formam uma enorme variedade de cadeias glicídicas, com diferentes tamanhos, o que permite elevado número de combinações.

As membranas das células animais contêm colesterol, o que não acontece nas células dos vegetais, que contêm outros esteróis. Quanto maior a concentração de esteróis, menos fluida é a membrana. As membranas das células procariontes não contêm esteróis, salvo raras exceções.

▪ A membrana é uma estrutura lipoproteica fluida

Todas as membranas celulares apresentam a mesma organização básica, sendo constituídas por duas camadas lipídicas fluidas e contínuas, onde estão inseridas moléculas proteicas (Figura 5.3), constituindo um mosaico fluido. Esse modelo explica todos os dados experimentais conhecidos e é válido para todas as membranas celulares (mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos, vesículas de secreção, peroxissomos, envelope nuclear, membrana plasmática, dentre outras).

As moléculas da camada dupla de lipídios estão organizadas com suas cadeias apolares (hidrofóbicas) voltadas para o interior da membrana, enquanto as cabeças polares (hidrofílicas) ficam voltadas para o meio extracelular ou para o citoplasma, que são meios aquosos. Essas duas camadas lipídicas estão associadas em razão da interação hidrofóbica de suas cadeias apolares. As proteínas da membrana apresentam resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos, e ficam mergulhadas na camada lipídica, de modo que:

- os resíduos hidrofóbicos das proteínas estão no mesmo nível das cadeias hidrofóbicas dos lipídios
- os resíduos hidrofílicos das proteínas ficam na altura das cabeças polares dos lipídios, em contato com o meio extracelular ou com o citoplasma.

Portanto, a membrana é constituída por uma camada hidrofóbica média e duas camadas hidrofílicas, uma interna (lado citoplasmático) e outra externa (Figuras 5.3 e 5.4).

Moléculas de hidratos de carbono associam-se a proteínas da membrana, para formar glicoproteínas, e a lipídios, formando glicolipídios que, na membrana plasmática, aparecem na face externa da membrana como componentes do glicocálice. Deve-se observar a acentuada assimetria entre as duas faces da membrana.

Diversos experimentos mostraram que as proteínas, exceto quando fixadas pelo citoesqueleto, se deslocam com facilidade no plano da membrana. Por exemplo, a fusão de células

Figura 5.3 ▪ As membranas celulares são constituídas por duas camadas de moléculas lipídicas, com as cadeias apolares (hidrofóbicas) colocadas no interior da membrana e as extremidades polares (hidrofílicas) voltadas para as superfícies da membrana. As moléculas das proteínas integrais estão mergulhadas na camada lipídica, com as porções hidrofóbicas no centro e as porções hidrofílicas nas superfícies da membrana. Algumas dessas proteínas atravessam toda a espessura da membrana (proteínas transmembrana). As proteínas periféricas não estão mergulhadas na membrana. A inserção dos microtúbulos e filamentos de actina na membrana também está representada neste desenho.

Figura 5.4 ▪ O desenho esquemático mostra proteínas transmembrana de passagem única (A) e de múltiplas passagens (B). Embora a ilustração mostre apenas uma molécula de proteína periférica, localizada na face externa da membrana, a face interna, como mostra a Figura 5.3, também apresenta proteínas periféricas ou extrínsecas.

humanas com células de camundongos – o que pode ser feito com tratamento pelo vírus Sendai – mostra que, após a fusão das células, as proteínas da membrana humana deslocam-se rapidamente, misturando-se com as proteínas da membrana da célula de camundongo. Estas últimas também se deslocam, porém com velocidade mais lenta, pois são proteínas maiores. Outro experimento que demonstra a fluidez da membrana é observado quando se adiciona a lectina concanavalina A a um cultivo de amebas. Essa lectina (chama-se lectina a uma proteína que se ligue fortemente a glicídios específicos) tem a propriedade de se ligar quimicamente a determinadas glicoproteínas da membrana e tem sido utilizada para o estudo dessas glicoproteínas, que atuam como receptores. Os receptores para a concanavalina A, que normalmente se distribuem por toda a membrana, ao se ligarem à concanavalina migram rapidamente, impulsionados pelo citoesqueleto, para uma determinada região, na qual ficam concentrados formando um capuz (Figura 5.5). Os deslocamentos descritos nesses dois exemplos mostram que a membrana é um fluido que permite a movimentação das proteínas dentro de uma matriz lipídica líquida.

Proteínas da membrana plasmática

Embora existam diferenças entre os lipídios, que influem nas propriedades das diversas membranas, a atividade metabólica das membranas depende principalmente das proteínas. Cada tipo de membrana tem suas proteínas características, principais responsáveis pelas funções da membrana.

A membrana plasmática contém grande variedade de proteínas, que podem ser divididas em dois grandes grupos, as integrais ou intrínsecas e as periféricas ou extrínsecas, dependendo da facilidade de extraí-las da bicamada lipídica.

As proteínas integrais estão firmemente associadas aos lipídios e só podem ser separadas da fração lipídica por meio de técnicas drásticas, como o emprego de detergentes. Setenta

Figura 5.5 ▪ Acúmulo dos receptores de concanavalina A em um dos polos da *Entamoeba histolytica*. Normalmente, os receptores se distribuem por toda a membrana, mas o tratamento pela concanavalina A promove a migração dos receptores para uma posição polar (*cap formation*). O material foi fixado em glutaraldeído e tratado com benzidina, para revelar a peroxidase utilizada para marcar a concanavalina A. Aumento: 3.500×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

Figura 5.2 ▪ Por serem desprovidos de organelas, os eritrócitos são um material adequado para o isolamento da membrana plasmática. Colocados em meio hipotônico, os eritrócitos se rompem, havendo perda da hemoglobina. Por centrifugação, podem-se obter as membranas isoladas.

solúvel em meio aquoso e uma região hidrofóbica, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios, são ditas anfipáticas. Entre os lipídios frequentes nas membranas celulares encontram-se fosfoglicerídios (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidiltreonina), esfingolipídios e colesterol. Os fosfoglicerídios e os esfingolipídios contêm o radical fosfato e são chamados fosfolipídios. Outro constituinte anfipático importante das membranas celulares são os glicolipídios, designação genérica para todos os lipídios que contêm hidratos de carbono, com ou sem radicais fosfato. Os glicolipídios mais abundantes nas células dos animais são os glicoesfingolipídios, que são componentes de muitos receptores da superfície celular. Os hidratos de carbono dos glicoesfingolipídios são, em geral, moléculas com seis átomos de carbono (hexoses), como a glicose, manose, fucose e galactose. Esses açúcares, associados em diferentes proporções, formam uma enorme variedade de cadeias glicídicas, com diferentes tamanhos, o que permite elevado número de combinações.

As membranas das células animais contêm colesterol, o que não acontece nas células dos vegetais, que contém outros esteróis. Quanto maior a concentração de esteróis, menos fluida é a membrana. As membranas das células procariontes não contêm esteróis, salvo raras exceções.

A membrana é uma estrutura lipoproteica fluida

Todas as membranas celulares apresentam a mesma organização básica, sendo constituídas por duas camadas lipídicas fluidas e contínuas, onde estão inseridas moléculas proteicas (Figura 5.3), constituindo um mosaico fluido. Esse modelo explica todos os dados experimentais conhecidos e é válido para todas as membranas celulares (mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos, vesículas de secreção, peroxissomos, envelope nuclear, membrana plasmática, dentre outras).

As moléculas da camada dupla de lipídios estão organizadas com suas cadeias apolares (hidrofóbicas) voltadas para o interior da membrana, enquanto as cabeças polares (hidrofílicas) ficam voltadas para o meio extracelular ou para o citoplasma, que são meios aquosos. Essas duas camadas lipídicas estão associadas em razão da interação hidrofóbica de suas cadeias apolares. As proteínas da membrana apresentam resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos, e ficam mergulhadas na camada lipídica, de modo que:

- os resíduos hidrofóbicos das proteínas estão no mesmo nível das cadeias hidrofóbicas dos lipídios
- os resíduos hidrofílicos das proteínas ficam na altura das cabeças polares dos lipídios, em contato com o meio extracelular ou com o citoplasma.

Portanto, a membrana é constituída por uma camada hidrofóbica média e duas camadas hidrofílicas, uma interna (lado citoplasmático) e outra externa (Figuras 5.3 e 5.4).

Moléculas de hidratos de carbono associam-se a proteínas da membrana, para formar glicoproteínas, e a lipídios, formando glicolipídios que, na membrana plasmática, aparecem na face externa da membrana como componentes do glicocálice. Deve-se observar a acentuada assimetria entre as duas faces da membrana.

Diversos experimentos mostraram que as proteínas, exceto quando fixadas pelo citoesqueleto, se deslocam com facilidade no plano da membrana. Por exemplo, a fusão de células

Figura 5.3 ▪ As membranas celulares são constituídas por duas camadas de moléculas lipídicas, com as cadeias apolares (hidrofóbicas) colocadas no interior da membrana e as extremidades polares (hidrofílicas) voltadas para as superfícies da membrana. As moléculas das proteínas integrais estão mergulhadas na camada lipídica, com as porções hidrofóbicas no centro e as porções hidrofílicas nas superfícies da membrana. Algumas dessas proteínas atravessam toda a espessura da membrana (proteínas transmembrana). As proteínas periféricas não estão mergulhadas na membrana. A inserção dos microtúbulos e filamentos de actina na membrana também está representada neste desenho.

Figura 5.4 ▪ O desenho esquemático mostra proteínas transmembrana de passagem única (A) e de múltiplas passagens (B). Embora a ilustração mostre apenas uma molécula de proteína periférica, localizada na face externa da membrana, a face interna, como mostra a Figura 5.3, também apresenta proteínas periféricas ou extrínsecas.

humanas com células de camundongos – o que pode ser feito com tratamento pelo vírus Sendai – mostra que, após a fusão das células, as proteínas da membrana humana deslocam-se rapidamente, misturando-se com as proteínas da membrana da célula de camundongo. Estas últimas também se deslocam, porém com velocidade mais lenta, pois são proteínas maiores. Outro experimento que demonstra a fluidez da membrana é observado quando se adiciona a lectina concanavalina A a um cultivo de amebas. Essa lectina (chama-se lectina a uma proteína que se ligue fortemente a glicídios específicos) tem a propriedade de se ligar quimicamente a determinadas glicoproteínas da membrana e tem sido utilizada para o estudo dessas glicoproteínas, que atuam como receptores. Os receptores para a concanavalina A, que normalmente se distribuem por toda a membrana, ao se ligarem à concanavalina migram rapidamente, impulsionados pelo citoesqueleto, para uma determinada região, na qual ficam concentrados formando um capuz (Figura 5.5). Os deslocamentos descritos nesses dois exemplos mostram que a membrana é um fluido que permite a movimentação das proteínas dentro de uma matriz lipídica líquida.

▪ Proteínas da membrana plasmática

Embora existam diferenças entre os lipídios, que influem nas propriedades das diversas membranas, a atividade metabólica das membranas depende principalmente das proteínas. Cada tipo de membrana tem suas proteínas características, principais responsáveis pelas funções da membrana.

A membrana plasmática contém grande variedade de proteínas, que podem ser divididas em dois grandes grupos, as integrais ou intrínsecas e as periféricas ou extrínsecas, dependendo da facilidade de extraí-las da bicamada lipídica.

As proteínas integrais estão firmemente associadas aos lipídios e só podem ser separadas da fração lipídica por meio de técnicas drásticas, como o emprego de detergentes. Setenta

Figura 5.5 ▪ Acúmulo dos receptores de concanavalina A em um dos polos da *Entamoeba histolytica*. Normalmente, os receptores se distribuem por toda a membrana, mas o tratamento pela concanavalina A promove a migração dos receptores para uma posição polar (*cap formation*). O material foi fixado em glutaraldeído e tratado com benzidina, para revelar a peroxidase utilizada para marcar a concanavalina A. Aumento: 3.500×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

por cento das proteínas da membrana plasmática são integrais, e aqui se incluem a maioria das enzimas da membrana, as glicoproteínas responsáveis pelos grupos sanguíneos M-N, proteínas transportadoras, receptores para hormônios, fármacos e lectinas. As lectinas são moléculas com ao menos dois sítios ativos que se ligam a hidratos de carbono específicos, podendo causar aglutinação de células. Foram descobertas nas plantas, mas hoje se sabe que existem na maioria dos seres vivos. Elas são muito utilizadas em biologia celular para analisar a composição química dos hidratos de carbono das glicoproteínas e glicolipídios presentes na face externa da membrana plasmática.

As moléculas das proteínas integrais, graças às regiões hidrofóbicas situadas na sua superfície, prendem-se aos lipídios da membrana por interação hidrofóbica, deixando expostas ao meio aquoso apenas suas partes hidrofílicas (Figuras 5.3 e 5.4). Algumas dessas moléculas proteicas atravessam inteiramente a bicamada lipídica, provocando saliência em ambas as superfícies da membrana, sendo denominadas proteínas transmembrana. As proteínas transmembrana podem atravessar a membrana uma única vez, ou então apresentar a molécula muito longa e dobrada, atravessando a membrana várias vezes, recebendo então o nome de proteínas transmembrana de passagem múltipla (Figura 5.4).

As proteínas extrínsecas podem ser isoladas facilmente, livres de lipídios, pelo emprego de soluções salinas. Essas proteínas se prendem às superfícies interna e externa da membrana celular por meio de vários mecanismos. Frequentemente, elas se fixam a moléculas glicosiladas de fosfatidil-inositol.

Os conhecimentos sobre as proteínas da membrana plasmática foram muito facilitados pelo estudo da membrana dos eritrócitos de mamíferos, porque esses glóbulos sanguíneos não apresentam um sistema interno de membranas. Neles, a única membrana existente é a membrana plasmática, que pode ser isolada junto com o citoesqueleto subjacente. A separação das proteínas da membrana dos eritrócitos e do seu citoesqueleto, por meio de eletroforese em gel, levou à descoberta de três proteínas principais que serão estudadas sumariamente a seguir, como exemplos.

Uma dessas proteínas é a espectrina. Trata-se de uma proteína extrínseca, fibrosa (molécula muito alongada), formada por dois polipeptídios, um com 220 kDa e o outro com 240 kDa (quilodáltons), aproximadamente. As moléculas de espectrina formam uma malha na superfície interna da membrana do eritrócito. Trata-se de uma proteína do citoesqueleto, provavelmente a principal responsável pela forma de disco bicôncavo do eritrócito.

A proteína chamada banda 3 (o nome vem da sua posição no gel) é uma proteína transmembrana que atravessa a bicamada lipídica diversas vezes. A molécula da banda 3 tem, portanto, uma forma pregueada. Ela contém alguns hidratos de carbono presos à parte da molécula localizada na face externa do eritrócito, o que é uma característica geral das glicoproteínas da membrana. A banda 3 serve como caminho para a passagem de ânions através da membrana. Quando passam pelos capilares pulmonares, os eritrócitos trocam HCO^- por Cl^- durante o processo de liberação de CO_2. A banda 3 é o canal por onde sai o HCO^- e entra o Cl^- nos eritrócitos.

A última das três principais proteínas da membrana dos eritrócitos é a glicoproteína denominada glicoforina, uma proteína intrínseca que, como a banda 3, também é transmembrana. Ela atravessa a membrana apenas uma vez, e a maior parte de sua molécula provoca saliência na superfície externa do eritrócito, onde exibe 16 cadeias glicídicas, com 100 moléculas de hidratos de carbono, que fazem parte do glicocálice. Existem, na molécula da glicoforina, um curto segmento hidrofóbico, que fica no interior da membrana, e dois segmentos hidrofílicos, um localizado no lado citoplasmático e o outro na superfície externa da membrana.

Glicoproteínas e glicolipídios são marcadores responsáveis pelos grupos sanguíneos

Um bom exemplo de marcadores da superfície celular são as glicoproteínas e glicolipídios que determinam os grupos sanguíneos. Os grupos M-N são devidos tanto à parte proteica como à parte glicídica da glicoforina, uma glicoproteína da membrana dos eritrócitos.

Os grupos A-B-O dependem de pequenas variações na estrutura dos hidratos de carbono presentes nos glicolipídios e glicoproteínas da membrana dos eritrócitos. As pessoas com sangue do tipo A apresentam a hexose modificada N-acetilgalactosamina, numa determinada posição das moléculas de hidratos de carbono da superfície. As pessoas com o sangue do tipo B têm, na mesma posição, a molécula de galactose. Já o tipo AB é caracterizado pela presença de moléculas de hidratos de carbono com galactose ou com N-acetilgalactosamina na mesma posição. No sangue do tipo O, a mesma posição se apresenta desocupada, não apresentando nenhum dos açúcares mencionados.

A membrana plasmática é assimétrica

Existe forte assimetria entre as duas faces da membrana plasmática, tanto na composição de lipídios como nas proteínas; por exemplo, na membrana dos eritrócitos a camada lipídica externa é mais rica em fosfatidilcolina, enquanto na camada lipídica em contato com o citoplasma predominam fosfatidiletanolamina (lecitina) e fosfatidilserina. Como a molécula de fosfatidilserina tem carga negativa, existe, além da diferença química entre as duas lâminas da bicamada lipídica, também uma diferença de carga elétrica. Outra diferença consiste na distribuição das moléculas de glicolipídios e glicoproteínas que se orientam com as extremidades contendo açúcares, provocando saliência na superfície da célula (Figuras 5.3 e 5.4), e nunca na face citoplasmática da membrana.

As Figuras 5.3 e 5.4 ilustram a assimetria na distribuição das proteínas. As proteínas periféricas estão concentradas na face citoplasmática da membrana, onde algumas podem ligar-se a filamentos do citoesqueleto. Na face externa aparecem as extremidades de proteínas integrais, incluindo os resíduos glicídicos das glicoproteínas, que irão se adicionar aos glicídios complexos dos glicolipídios e a outras moléculas para constituir uma camada de açúcares, na face externa da membrana, denominada glicocálice.

Visualização das proteínas integrais das membranas

Isso é possível pela técnica de criofratura, que consiste no congelamento rápido do tecido, seguido de sua fratura. As superfícies de fratura são dessecadas e sombreadas com uma camada de metal pesado depositada em ângulo agudo e, depois, com uma camada de carbono que servirá de suporte. Em seguida, os componentes celulares são dissolvidos, restando uma réplica da superfície de fratura. Essa réplica será então estudada no microscópio eletrônico.

Por meio dessa técnica, a membrana sofre fratura na região que fica entre as duas camadas lipídicas, porque os lipídios estão presos por interações hidrofóbicas, um tipo de ligação fraca. Formam-se, assim, artificialmente, duas lâminas que expõem as faces situadas no interior da membrana. A lâmina interna, em contato com o citoplasma, expõe a denominada face P (protoplasmática), e a externa expõe a chamada face E (externa). A face P olha para fora da célula e a face E olha em sentido oposto (Figura 5.6). A técnica de criofratura mostra muito bem as proteínas integrais da membrana, que aparecem como partículas presas principalmente à face P, enquanto a face E mostra as cavidades onde essas partículas estavam encaixadas.

As unidades de membrana têm diferentes funções

No microscópio eletrônico, a membrana plasmática e as demais membranas celulares aparecem como duas camadas escuras, separadas por uma camada clara central. Admite-se que esse aspecto trilaminar decorre da redução do tetróxido de ósmio utilizado como fixador e de sua deposição nas extremidades polares dos lipídios. A parte central clara corresponderia às longas cadeias lipídicas apolares (Figura 5.7).

A mesma estrutura trilaminar da membrana plasmática é vista em todas as membranas da célula. Por isso, a estrutura trilaminar foi denominada unidade de membrana ou membrana unitária. A lâmina central, clara, mede cerca de 3,5 nm, e as lâminas escuras medem aproximadamente 2,0 nm cada uma. A espessura total das membranas unitárias varia de 7 a 10 nm.

Apesar de morfologicamente parecidas, as unidades de membrana não são iguais, nem na morfologia, nem nas funções. Com o aperfeiçoamento das técnicas de preparação dos tecidos para estudo no microscópio eletrônico, observou-se que as unidades de membrana apresentam diferenças na espessura de suas lâminas. Por outro lado, membranas isoladas mostram propriedades enzimáticas muito diferentes, bem como diversidades em sua composição lipídica. Portanto, embora a organização molecular básica das membranas seja a mesma, elas variam muito na composição química e nas propriedades biológicas.

Uma mesma membrana, como a membrana plasmática, pode mostrar áreas diferenciadas. Por exemplo, a membrana dos microvilos das células do epitélio do revestimento intestinal contém dipeptidases e dissacaridases, enzimas responsáveis pelas fases finais da digestão das proteínas e glicídios, respectivamente, e que não existem no resto da membrana plasmática dessas células.

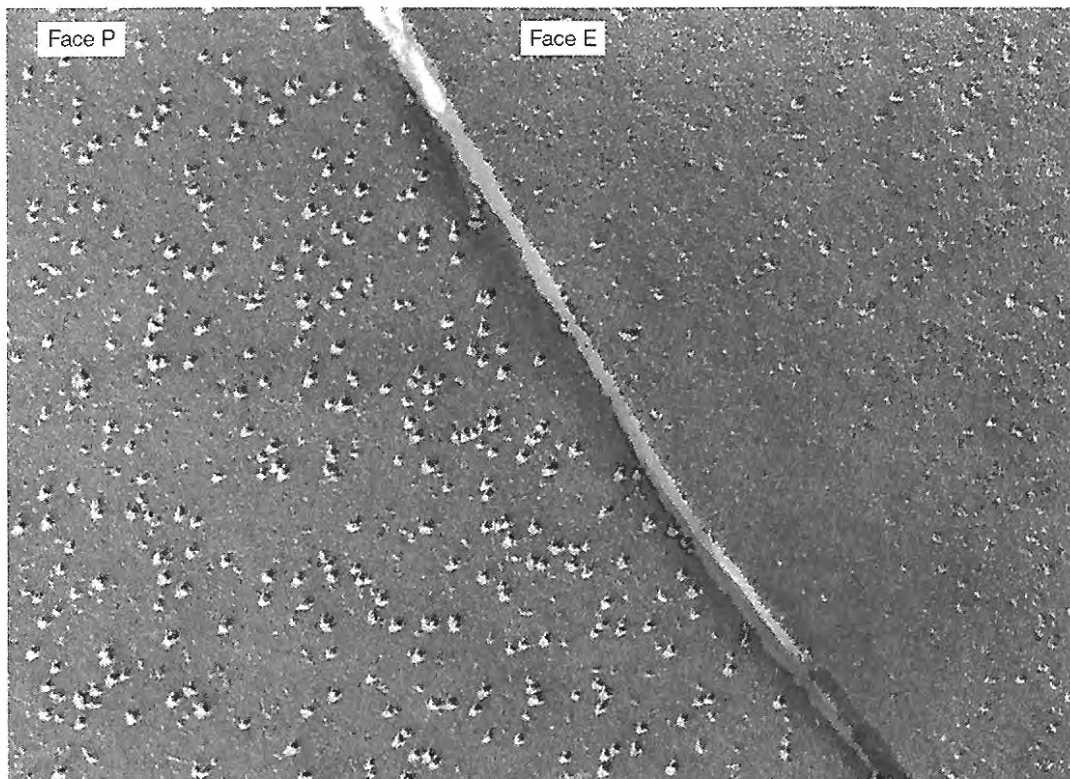



Figura 5.6 ▪ Microscopia eletrônica de réplica da membrana plasmática criofraturada. A fratura tem lugar entre a lâmina interna e a externa da membrana. A maioria das moléculas proteicas permanece aderente à superfície da lâmina interna voltada para fora da célula (face P). Por isso, a face P das membranas plasmáticas mostra numerosas partículas globulares. A superfície interna da lâmina externa, conhecida como face E, apresenta poucas micelas proteicas. Aumento: 150.000×. (Cortesia de A. Martínez-Palomo.)

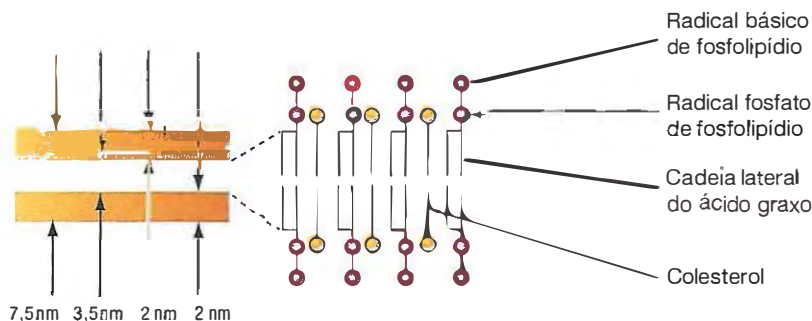



Figura 5.7 ▪ *À esquerda*, aspecto da membrana vista ao microscópio eletrônico (duas lâminas escuras e uma lâmina central, clara). *À direita*, disposição dos lipídios.

▪ Glicocálice

A superfície externa da membrana plasmática apresenta uma região rica em hidratos de carbono ligados a proteínas ou a lipídios, denominada glicocálice (Figuras 5.8 e 5.9).

Em sua maior parte, o glicocálice é uma extensão da própria membrana e não uma camada separada, sendo constituído: (1) pelas porções glicídicas das moléculas de glicolipídios da membrana plasmática, que provocam saliência na superfície da membrana; (2) por glicoproteínas integrais da membrana ou adsorvidas após secreção; e (3) por algumas proteoglicanas, todas secretadas e, em seguida, adsorvidas pela superfície celular. Determinados glicolipídios contêm em suas moléculas uma parte glicídica muito complexa, contendo resíduos de D-glicose, de D-galactose, de N-acetil-D-galactosamina e de ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico).

Dentre as glicoproteínas secretadas e que passam a fazer parte do glicocálice, uma das mais abundantes é a fibronectina. Trata-se de uma molécula em forma da letra V, constituída por dois polipeptídios semelhantes, cada um pesando 250 kDa (quilodáltons). A molécula de fibronectina apresenta regiões que se combinam com moléculas do meio extracelular e da superfície de outras células. Tem a função de unir as células umas às outras e à matriz extracelular (Capítulo 12). A fibronectina estabelece uma continuidade entre o citoesqueleto e as macromoléculas do material extracelular dos tecidos (matriz extracelular). Os microfilamentos de actina do citoesqueleto ligam-se a moléculas da proteína vinculina que, por sua vez, prendem-se a uma proteína intrínseca da membrana, com peso molecular de 140 kDa (quilodáltons), e essa proteína se liga à fibronectina do glicocálice. Por outras regiões de sua molécula, a fibronectina liga-se a proteínas da matriz extracelular, dentre as quais se destaca o colágeno. O conjunto de macromoléculas proteicas constituído pela actina, vinculina, proteína intrínseca de 140 kDa e fibronectina, denominado fibronexus, é um elo de união funcional, dinâmico, entre o citoesqueleto de uma célula e a superfície de outras células ou a matriz extracelular dos tecidos.

Contudo, a fibronectina não é a única proteína que estabelece conexão entre as células e a matriz extracelular. As células dos tecidos epiteliais de revestimento, por exemplo, ligam-se ao colágeno por meio da glicoproteína laminina, que é secretada pelas células epiteliais e passa a fazer parte do seu glicocálice.

O glicocálice é funcionalmente importante e sua composição não é estática; varia de um tipo celular para outro e, na

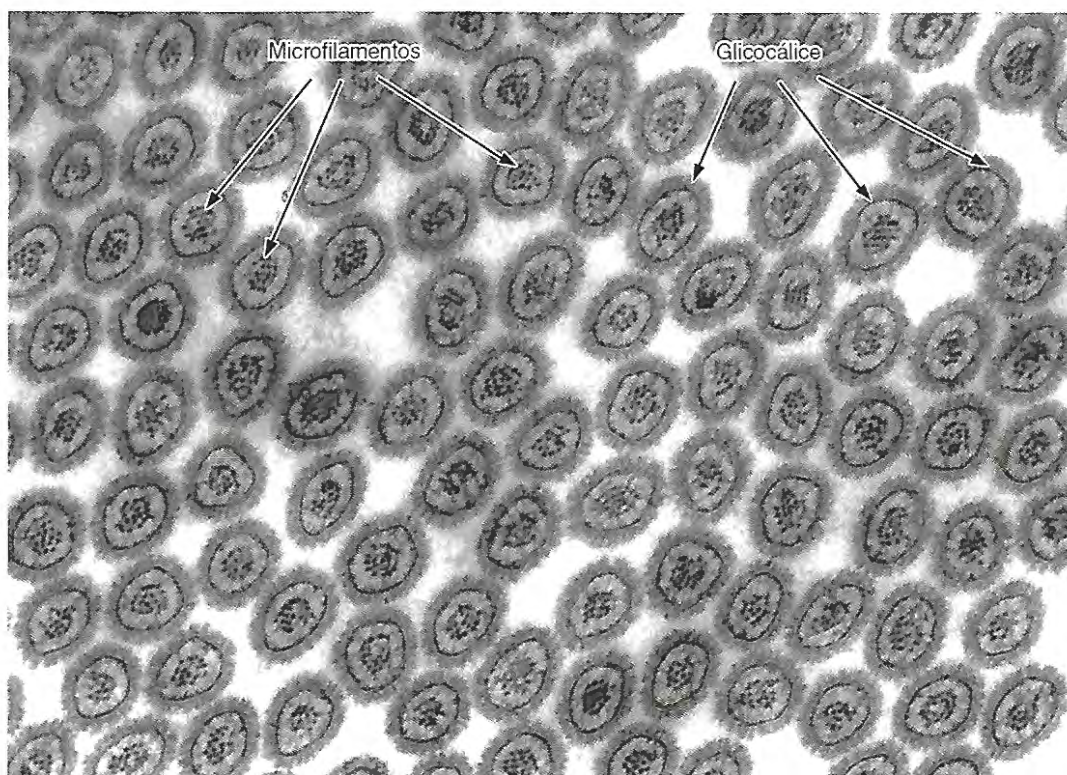



Figura 5.8 ▪ Glicocálice nos prolongamentos (microvilos) das células intestinais. Os microvilos, com filamentos no interior, aparecem em corte transversal. Observe a membrana plasmática, da qual se origina o glicocálice. Eletromicrografia. Aumento: 100.000×.

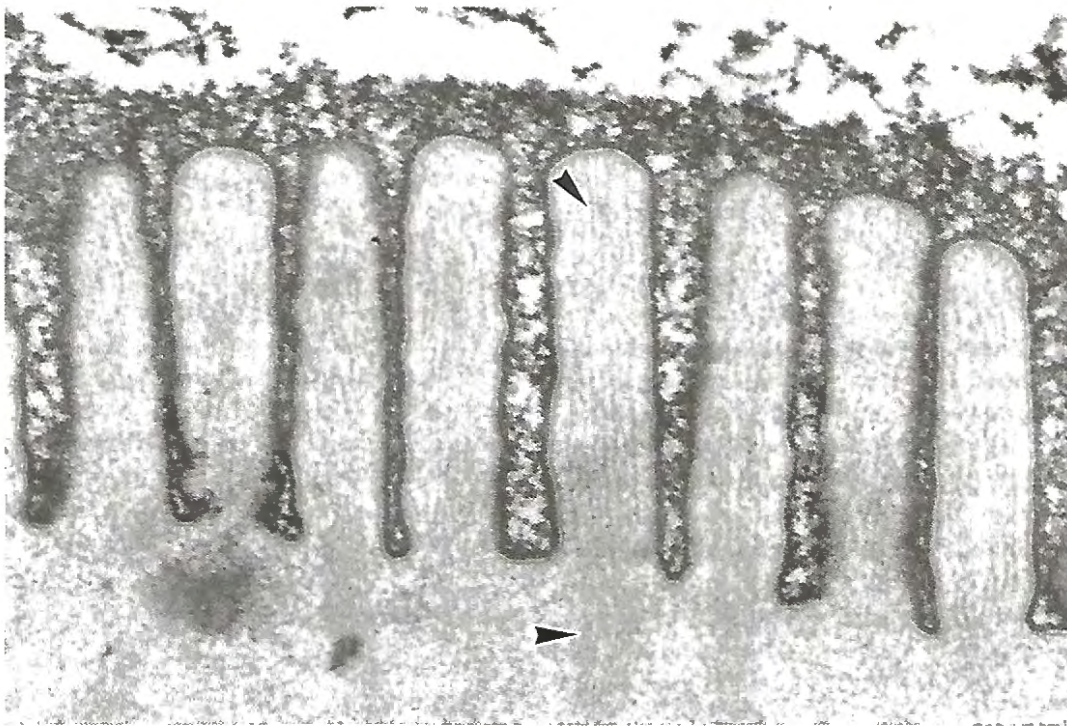



Figura 5.9 ▪ Glicocálice das células epiteliais do intestino de rato, demonstrado pelo vermelho de rutênio. Observe também os feixes de filamentos que penetram nos microvilos (*cabeças de setas*). Microscopia eletrônica. Aumento: 84.000x. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

mesma célula, varia com a região da membrana e conforme a atividade funcional da célula em determinado momento.

As células se reconhecem

Numerosas evidências demonstram que a superfície celular é dotada de especificidade que permite às células se reconhecerem mutuamente e estabelecerem certos tipos de relacionamento.

Cultivando-se células hepáticas e renais, dissociadas e misturadas, em meio líquido e mantido sob leve agitação, após determinado tempo observa-se o surgimento de dois aglomerados celulares; um deles contém somente células hepáticas, enquanto o outro contém apenas células renais. No começo, as células estavam individualmente isoladas e misturadas; entretanto, como o cultivo foi mantido em agitação leve, as células se chocaram ao acaso e as do mesmo tipo aceitaram-se mutuamente, aderindo umas às outras e formando um esboço de tecido.

Outro exemplo que mostra esse papel biológico da membrana é o fenômeno conhecido como inibição por contato. Células cultivadas presas a um suporte – como uma lamínula, por exemplo –, proliferaram formando uma lâmina de uma única camada de células. Iniciando-se o cultivo com vários grupos celulares, colocados em locais separados de uma mesma lamínula, as células de cada grupo multiplicar-se-ão sobre a lamínula, formando uma camada celular. Cada grupo de células cresce separadamente, mas, quando as células de um grupo se encontram com as células de outro grupo, as mitoses cessam. É interessante notar que o mesmo experimento feito com células cancerosas mostra que estas perdem a propriedade de inibição por contato. Depois de se encontrarem, as células cancerosas continuam se dividindo e amontoam-se desordenadamente umas sobre as outras.

Como acontece com as macromoléculas em geral, as proteínas da membrana são imunogênicas, isto é, promovem uma resposta imunitária quando penetram num organismo estranho. Por exemplo, o transplante de tecidos de um animal para outro estimula o animal receptor a produzir células e anticorpos que atacam as proteínas da membrana plasmática das células transplantadas. Em humanos e em outros mamíferos, o mecanismo para distinguir o que é próprio do organismo (*self*) daquilo que é estranho (*non-self*) está na dependência de um grupo de moléculas glicoproteicas da membrana, que formam saliência na superfície externa e são chamadas de complexo principal de histocompatibilidade ou MHC (*major histocompatibility complex*). Há duas classes de MHC, denominadas MHCI e MHCII. Todas as células do organismo, exceto algumas células do sistema imunitário, contêm na superfície MHCI. Determinadas células do sistema imunitário apresentam o complexo MHCII em suas superfícies. Os dois MHC são glicoproteínas cujas moléculas têm uma parte constante e uma parte variável. A parte variável difere muito, na sequência de aminoácidos, de pessoa para pessoa, de tal maneira que não existe a possibilidade de mais de uma pessoa apresentar MHC idênticos. A única exceção são os gêmeos univitelinos ou gêmeos idênticos, por serem provenientes do mesmo óvulo e do mesmo espermatozoide. Portanto, suas células são geneticamente iguais, e, nesses gêmeos, as proteínas celulares são idênticas. Para minimizar a resposta imunitária, causa da rejeição dos transplantes, procuram-se doadores cujos complexos MHC sejam o mais semelhante possível aos do receptor.

Transporte através da membrana

Para a maioria das substâncias, existe uma relação direta entre sua solubilidade nos lipídios e sua capacidade de penetração nas células. De modo geral, os compostos hidrofóbicos, solúveis nos lipídios, como os ácidos graxos, hormônios esteroides e anestésicos, atravessam facilmente a membrana.

Já as substâncias hidrofílicas, insolúveis nos lipídios, penetram nas células com mais dificuldade, dependendo do tamanho da molécula e, também, de suas características químicas. A configuração molecular poderá permitir que a substância seja transportada por intermédio de um dos mecanismos especiais desenvolvidos durante a evolução, como o transporte ativo e a difusão facilitada.

▪ Permeabilidade à água

A membrana celular é muito permeável à água. Colocadas em uma solução hipotônica, as células aumentam de volume em razão da penetração de água (Figura 5.1). Se o aumento de volume for muito acentuado, a membrana plasmática se rompe e o conteúdo da célula extravasa, fenômeno conhecido como lise celular. Em contrapartida, quando colocadas em solução hipertônica, as células diminuem de volume em razão da saída de água (Figura 5.1). Havendo entrada ou saída de água, a forma da célula também se altera, por ser em parte determinada pelo estado de hidratação dos coloides celulares. Nas soluções isotônicas, o volume e a forma da célula não se alteram.

Nas células das plantas ocorre fenômeno semelhante ao observado nas dos animais, mas as consequências são diferentes, devido à parede de celulose. Em solução hipertônica, as células das plantas perdem água e diminuem de volume, separando-se o citoplasma da parede celular, que é rígida. Esse fenômeno é chamado plasmólise. Quando colocada em meio hipotônico, a célula vegetal aumenta de volume, como o eritrócito, mas não se rompe devido à parede de celulose. Essa parede limita o aumento de volume da célula e o mantém dentro de uma faixa que não excede a resistência da membrana plasmática. O aumento de volume sofrido por uma célula vegetal, ao passar de uma solução hipertônica para uma solução hipotônica, chama-se desplasmólise (Figura 5.1).

Como foi visto anteriormente, existe uma relação direta entre a solubilidade das substâncias em lipídios e a facilidade com que elas penetram nas células. Entretanto, a membrana também é muito permeável à água e a determinadas substâncias hidrófilas e insolúveis em lipídios, como a ureia e o glicerol, graças a moléculas proteicas localizadas na espessura da membrana, atravessando-a de uma face a outra. Essas proteínas transmembrana formam "poros funcionais", isto é, caminhos hidrofílicos pelos quais passam muitos íons e moléculas que não conseguem atravessar a barreira lipídica.

▪ Difusão passiva

Muitas moléculas entram nas células ou delas saem por difusão passiva, isto é, como a distribuição do soluto tende a ser uniforme em todos os pontos do solvente, o soluto penetra na célula quando sua concentração é menor no interior celular do que no meio externo, e sai da célula no caso contrário. A força que impulsiona o soluto para dentro ou para fora da célula é a agitação térmica das moléculas do soluto. A difusão passiva não gasta energia. Trata-se de um processo físico de difusão a favor de um gradiente.

▪ Transporte ativo

Outro processo de passagem através da membrana celular é o transporte ativo. Nesse caso, há consumo de energia fornecida por ATP e a substância pode ser transportada de um local de baixa concentração para outro de alta concentração. Portanto, o soluto na difusão ativa é transportado contra um gradiente, que pode ser um gradiente apenas químico, no caso de solutos não eletrólitos, ou então um gradiente elétrico e químico, quando o soluto é ionizado. Assim, por exemplo, quando a célula transporta íons sódio (Na^+) do citoplasma (onde sua concentração é baixa) para o meio extracelular (onde sua concentração é mais alta), deve ser vencido um obstáculo químico, representado pela concentração elevada de íons sódio no meio extracelular, e um obstáculo elétrico, correspondente à soma das cargas positivas dos íons sódio, que dificulta a entrada de novos íons positivos no espaço extracelular.

▪ Difusão facilitada

Numerosas substâncias, como a glicose e alguns aminoácidos, penetram nas células por difusão facilitada, sem gasto de energia. Nesse caso, a difusão se processa a favor de um gradiente, porém em velocidade maior do que na difusão passiva.

A velocidade com que se processa a difusão facilitada é estéreo-específica. Em consequência, os compostos isômeros geralmente penetram com velocidades muito diferentes. Nos eritrócitos existe difusão facilitada de D-glicose e D-galactose, mas o mesmo não ocorre em relação às formas L desses dois açúcares.

A velocidade da difusão facilitada não é proporcional à concentração do soluto, exceto em concentrações muito baixas. Elevando-se gradativamente a concentração da molécula penetrante, chega-se a um ponto de saturação, além do qual a velocidade de penetração não aumenta mais. Esta e outras propriedades mostram que, na penetração facilitada, a substância penetrante se combina com uma molécula transportadora ou permease, localizada na membrana plasmática (Figura 5.10). Quando todas as moléculas transportadoras estão ocupadas, a velocidade de penetração não pode aumentar.

▪ Transporte impulsionado por gradientes iônicos

A célula pode utilizar a energia potencial de gradientes de íons, geralmente Na^+, mas também K^+ e H^+, para transportar moléculas e íons através da membrana. O epitélio de revestimento do intestino delgado é um exemplo elucidativo para a compreensão desse tipo de transporte contra gradiente. A ingestão de alimentos leva glicose para o lúmen do intestino delgado, de onde ela deve ser absorvida pelas células do epitélio e transferida para a corrente sanguínea. O transporte de glicose pela membrana plasmática da porção apical das células epiteliais do revestimento intestinal se faz contra o gradiente de glicose existente no citoplasma dessas células. Foi observado que essa penetração de glicose se faz concomitantemente com a penetração de Na^+. Trata-se de um cotransporte, realizado com gasto de energia fornecida pelo gradiente de Na^+. A concentração de Na^+ no citoplasma das células é muito

Glicose

Sítio de ligação da glicose

Modificação na conformação inicial

Permease para glicose

Membrana plasmática

Abertura de canal

A permease volta à sua conformação inicial

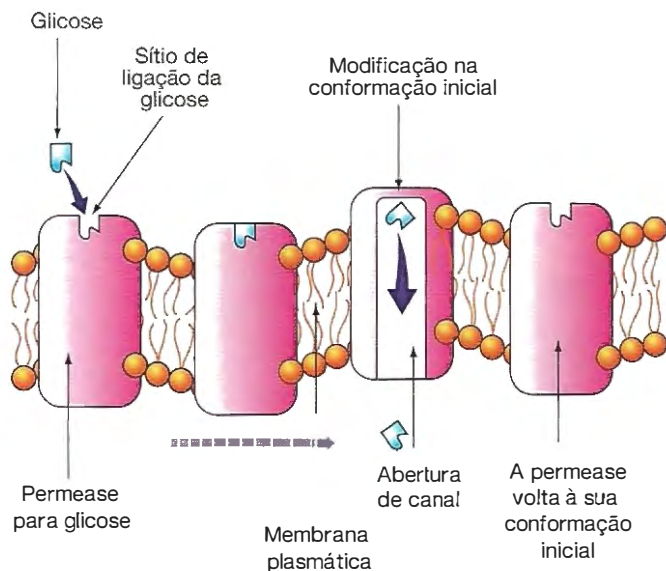



Figura 5.10 ▪ Esquema da permease da glicose. Esse açúcar tem sua penetração facilitada por uma proteína integral da membrana que modifica sua forma ao captar glicose do meio extracelular. Admite-se que a modificação conformacional da permease facilita o transporte de glicose sem gasto de energia.

baixa, em razão da atividade das moléculas proteicas que, por transporte ativo, bombeiam Na^+ para fora das células (bombas de Na^+). Como a concentração de Na^+ é alta no lúmen do intestino, esses íons tendem a penetrar constantemente nas células epiteliais do revestimento intestinal. A energia do movimento dos íons Na^+ é utilizada por essas células para realizar o cotransporte de glicose para dentro da célula contra um gradiente de glicose. Portanto, os íons Na^+ penetram nas células epiteliais a favor de um gradiente, fornecendo energia para impulsionar as moléculas de glicose contra um gradiente. Esse tipo de cotransporte, que movimenta íons e moléculas na mesma direção, no exemplo para dentro da célula, chama-se simporte (Figura 5.11).

Nesses casos de cotransporte, a proteína transportadora que possibilita o simporte capta tanto glicose como Na^+ no meio extracelular (luz do intestino). A liberação do Na^+ no citoplasma, no qual a concentração de Na^+ é baixa, causa uma modificação

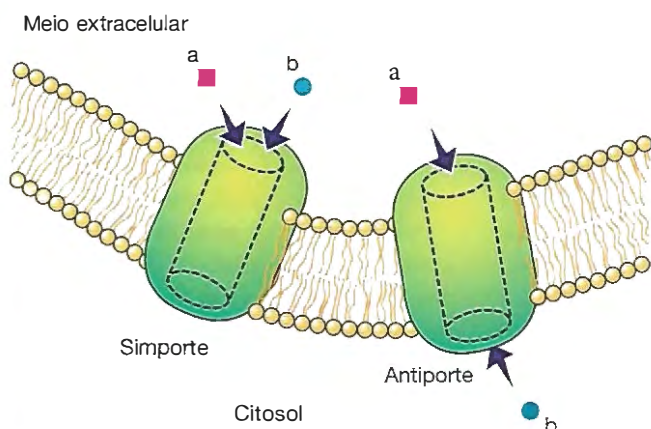



Figura 5.11 ▪ Nesta ilustração, os íons representados pelos quadrados (a), mais concentrados do meio extracelular, impulsionam a molécula (b) para dentro da célula, no simporte. Quando a molécula é transportada em sentido oposto ao movimento dos íons, o sistema se denomina antiporte. A energia derivada do gradiente iônico de (a) é utilizada para movimentar a molécula ou íon (b).

na forma da molécula transportadora, que perde sua afinidade para a glicose. Desse modo, a molécula de glicose captada no lúmen intestinal é liberada no interior da célula epitelial do intestino. Em seguida, a glicose difunde-se no citoplasma e, pela parte basal das células epiteliais, passa, por difusão facilitada, para o tecido adjacente, onde penetra nos capilares sanguíneos para ser distribuída pelo organismo.

Em outros casos de cotransporte, foi observado que o íon que fornece energia e a molécula que é transportada movem-se em direções opostas, constituindo o que se denomina antiporte (Figura 5.11). Nos antiportes, quando o íon fornecedor de energia se movimenta para o citoplasma, a molécula transportada é transferida para fora da célula, e vice-versa.

Muitas moléculas importantes para as células, como hidratos de carbono e aminoácidos, bem como íons, podem ser transportadas por meio de simportes e antiportes, além dos outros processos de transporte já mencionados.

▪ *Transporte em quantidade*

Pelos processos já descritos neste capítulo, moléculas pequenas e íons atravessam a membrana plasmática e entram no citoplasma ou dele saem.

Entretanto, as células também são capazes de transferir para o seu interior, em bloco, grupos de macromoléculas (proteínas, polissacarídios, polinucleotídios) e, até mesmo, partículas visíveis ao microscópio óptico, como bactérias e outros microrganismos. Esse transporte depende de alterações morfológicas da superfície celular, onde se formam dobras que englobam o material a ser introduzido na célula (Capítulo 10).

▪ *Fagocitose*

É o nome dado ao processo pelo qual a célula, graças à formação de pseudópodos, engloba no seu citoplasma partículas sólidas, que, por suas dimensões, são visíveis ao microscópio óptico. Portanto, a fagocitose pode ser facilmente observada pelo estudo de células vivas com os microscópios de contraste de fase. A fagocitose tem lugar quando a partícula se fixa a receptores específicos da membrana celular, capazes de desencadear uma resposta da qual participa o citoesqueleto (Figuras 5.12 e 5.13). Nos protozoários, a fagocitose é um processo de alimentação; nos animais, representa um mecanismo de defesa

Nos mamíferos, a fagocitose é feita principalmente por células especializadas na defesa do organismo, como os neutrófilos e macrófagos (Figura 5.14). Todavia, conforme mostra a Figura 5.15, vários microrganismos desenvolveram, durante a evolução, diversos mecanismos para escapar à morte intracelular após serem fagocitados. (O assunto desta seção também é abordado no Capítulo 10.)

▪ *Pinocitose: captação ativa de macromoléculas em solução*

O termo pinocitose foi utilizado inicialmente para designar o englobamento de gotículas de líquido, observado em células cultivadas. Essas células emitem delgadas expansões do citoplasma que englobam gotículas do meio de cultivo em

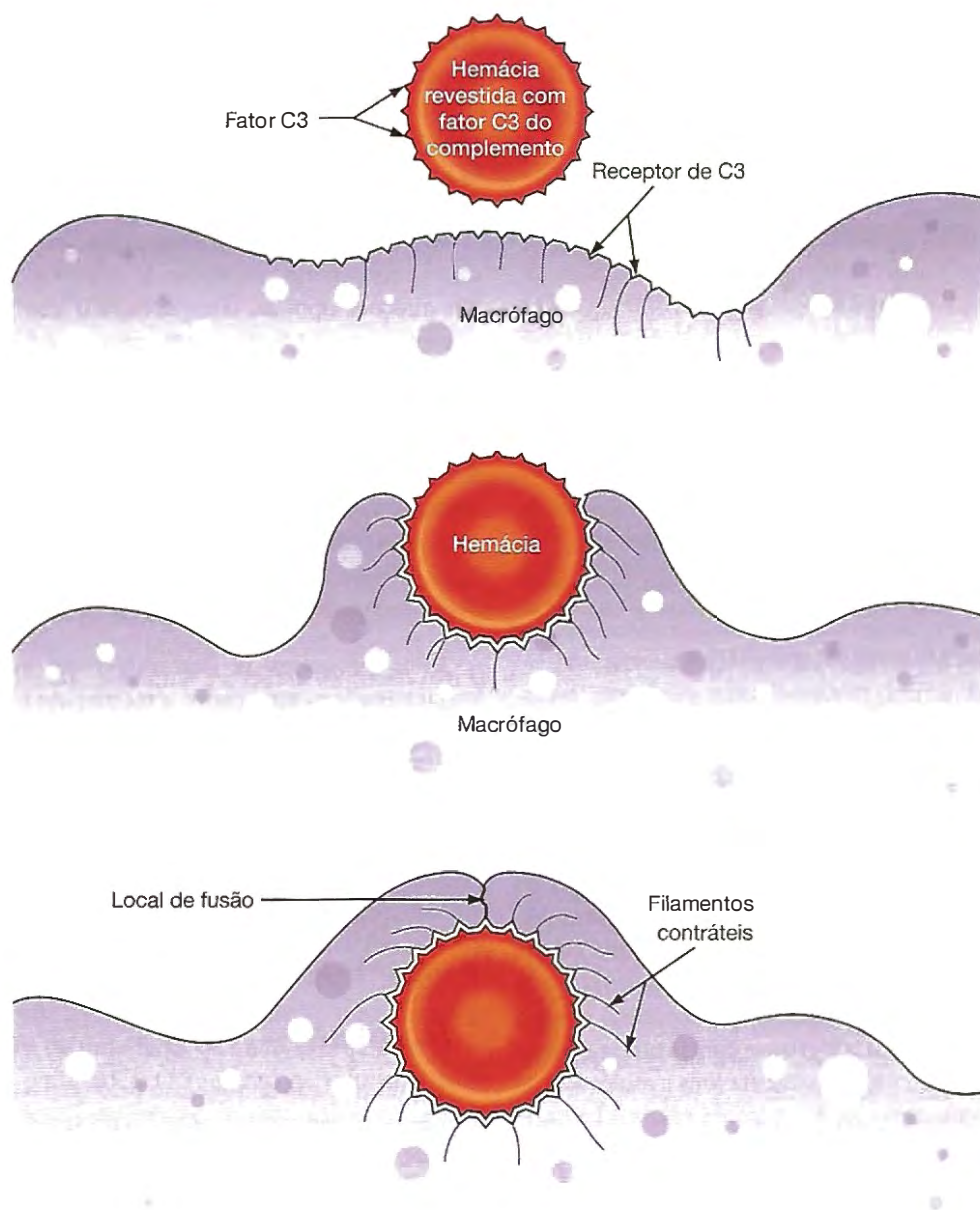



Figura 5.12 ▪ O esquema mostra que a fagocitose resulta da interação de moléculas específicas. O exemplo mostra hemácias experimentalmente revestidas pelo fator C3 do complemento (o complemento é um grupo de proteínas do plasma sanguíneo, com diversas funções). A combinação sucessiva das moléculas do fator C3 com os receptores pode ser comparada ao fechamento de um zíper. Desse modo, a hemácia é englobada em um vacúolo. O receptor estimulado promove a polimerização de monômeros de actina do citosol, que vão formar microfilamentos contráteis. (Com base em Silverstein, S.C., Michl, J. and Loike, J.D.: *International Cell Biology 1980-1981*. Schweiger, H.G. (ed.) Springer, New York, 1981.)

vesículas de até 1 μm de diâmetro. Todavia, essa modalidade de pinocitose é restrita a raros tipos celulares, principalmente nas culturas de células.

Na pinocitose comum, observada em grau variável em todas as células, ocorre a invaginação de uma área localizada da membrana plasmática, formando-se pequenas vesículas que são puxadas pelo citoesqueleto e penetram no citoplasma. Essas vesículas carregam líquido e são de tamanho uniforme, com 200 nm de diâmetro (Figura 5.16). Em alguns casos, como nas células endoteliais dos capilares sanguíneos, as vesículas de pinocitose formadas em um lado da célula atravessam o citoplasma e lançam seu conteúdo no outro lado da célula, servindo como transportadoras.

Na pinocitose não seletiva, as vesículas englobam todos os solutos que estiverem presentes no fluido extracelular. Todavia, na maioria das células, a pinocitose é seletiva e realizada em duas etapas. Na primeira, a substância a ser incorporada adere a receptores da superfície celular; na segunda, a membrana se afunda e o material a ela aderido passa para uma vesícula. Esta se destaca da superfície celular e penetra no citoplasma (Figura 5.17). Um exemplo bem estudado de pinocitose seletiva é encontrado nas células precursoras das hemácias que incorporam transferrina, uma proteína plasmática transportadora do ferro que é utilizado para a síntese de hemoglobina. Contudo, só existe pinocitose em locais específicos de membrana, onde há receptores para as moléculas de transferrina. Essa pinocitose tem a vantagem de possibilitar a incorporação ao citoplasma de grandes quantidades de um tipo de molécula, sem a penetração concomitante de muita água. (O assunto desta seção também é abordado no Capítulo 10.)

Bactéria recoberta por imunoglobina
Receptores da membrana
1
2
C
REG
G
M
3
4
Lisossomos
REG

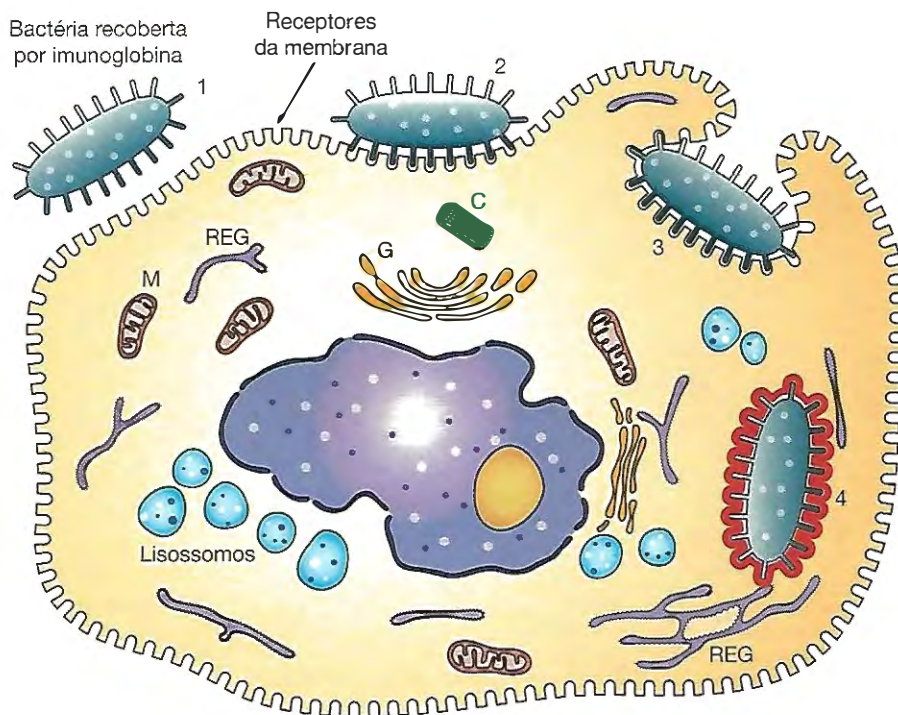



Figura 5.13 ▪ Etapas (1 a 4) da fagocitose de uma bactéria já atacada por imunoglobulina. A superfície do macrófago tem receptores para o segmento Fc da imunoglobulina, que promovem a aderência da bactéria. Em 4 aparece a bactéria dentro de um fagossomo, onde poderá ser morta e, depois, digerida pelas enzimas dos lisossomos. M, mitocôndria; REG, retículo endoplasmático granular; C, centríolo; G, aparelho de Golgi. (Reproduzido, com autorização, de Carneiro, J. Bases Celulares para a Fisiopatologia. *In*: Marcondes, M. *et al*. *Clínica Médica*, 3ª ed., Guanabara Koogan, Rio, 1984.)

Reciclagem de membrana plasmática

Grande quantidade de membrana plasmática é introduzida no citosol, sem que se note encolhimento da membrana, sem diminuição do tamanho da célula e sem a síntese de novas moléculas para reconstituir a membrana removida. A enorme quantidade de membrana retirada da superfície celular pelos processos de fagocitose e pinocitose é compensada pela devolução de membrana pelas vesículas de secreção, e também pelo retorno da membrana das vesículas de pinocitose depois que elas liberam suas cargas nos endossomos (Figura 5.17). Assim, existe nas células em geral um fluxo constante de membranas, entre a membrana plasmática e a membrana das vesículas de fagocitose, pinocitose e de secreção. As células se mantêm do mesmo tamanho não somente pela síntese de nova membrana plasmática, mas pela devolução da membrana retirada.

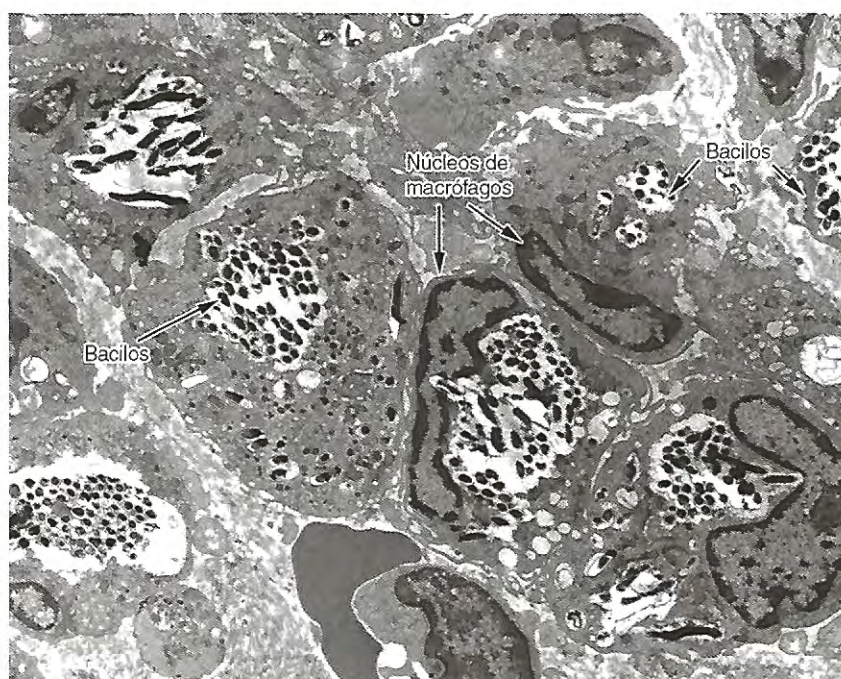



Figura 5.14 ▪ A micrografia eletrônica mostra macrófagos onde está se reproduzindo o *Mycobacterium leprae*, bacilo responsável pela hanseníase.

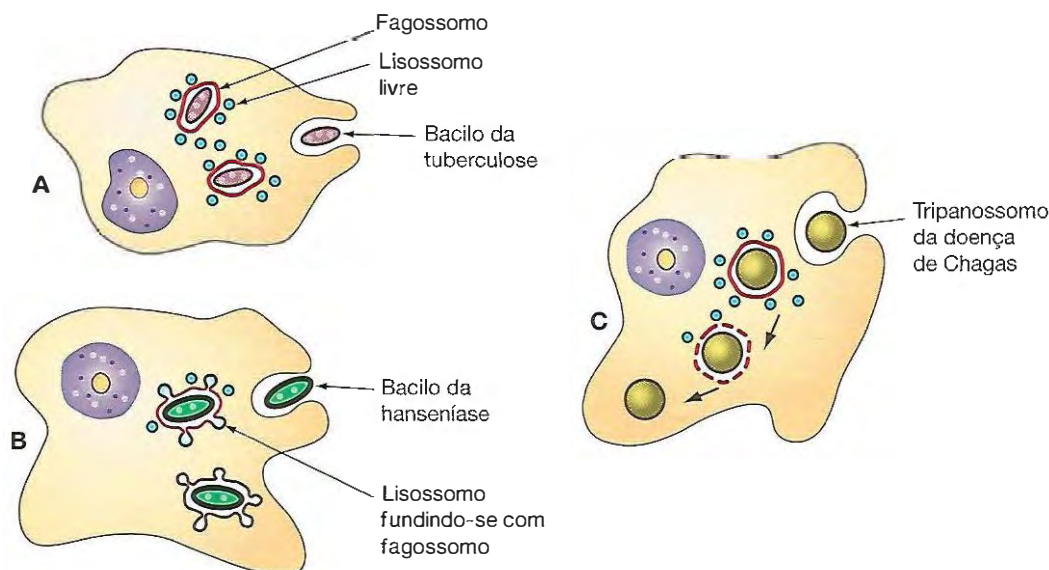



Figura 5.15 ▪ Ilustração de três exemplos de mecanismos utilizados por microrganismos patogênicos (*pathos*, doença, e *genesis*, geração) fagocitados, para evitar serem atacados pelos lisossomos. **A.** Alguns microrganismos, como o bacilo da tuberculose, secretam uma substância que impede a fusão dos lisossomos com os fagossomos. **B.** Já o bacilo causador da hanseníase se defende desenvolvendo uma cápsula resistente e impermeável às enzimas lisossômicas. **C.** Outro exemplo é dado pelo *Trypanosoma cruzi*, que, ao ser fagocitado, rapidamente digere a membrana que o envolve (membrana do fagossomo), tornando-se livre no citoplasma.

Microvilos são prolongamentos que aumentam a superfície de absorção das células

Nos metazoários existem células especializadas na absorção de substâncias diversas. Nos mamíferos, as células mais bem estudadas são as do intestino delgado e do rim. As células que revestem a superfície interna do intestino delgado são colunares, dispostas em camada única, e suas superfícies em contato com os alimentos apresentam numerosas digitações – os microvilos (Figura 5.18). Cada microvilo ou microvilosidade é uma expansão do citoplasma recoberta por membrana e contendo numerosos feixes de microfilamentos de actina responsáveis pela manutenção da forma dos microvilos; seu glicocálice é mais desenvolvido do que no resto da célula

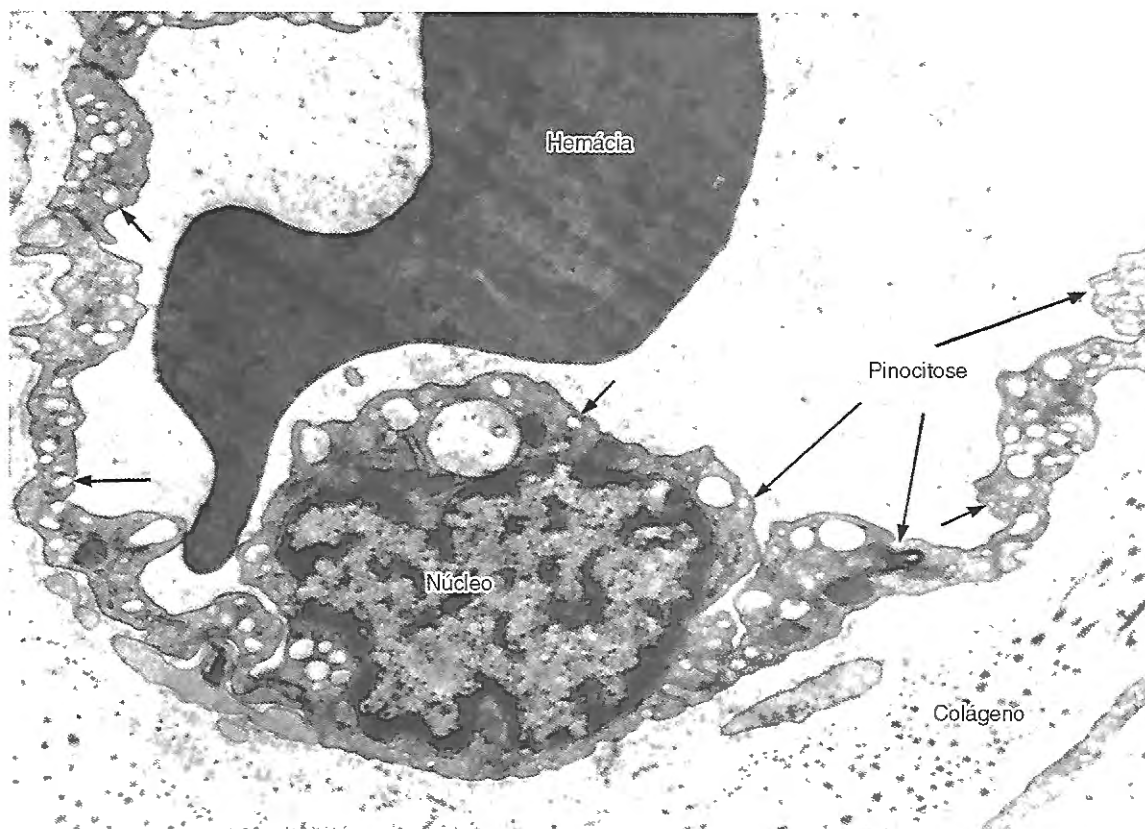



Figura 5.16 ▪ Parede de vaso capilar sanguíneo mostrando células endoteliais com numerosas vesículas de pinocitose (*setas*). Eletromicrografia. Aumento: 18.000×.

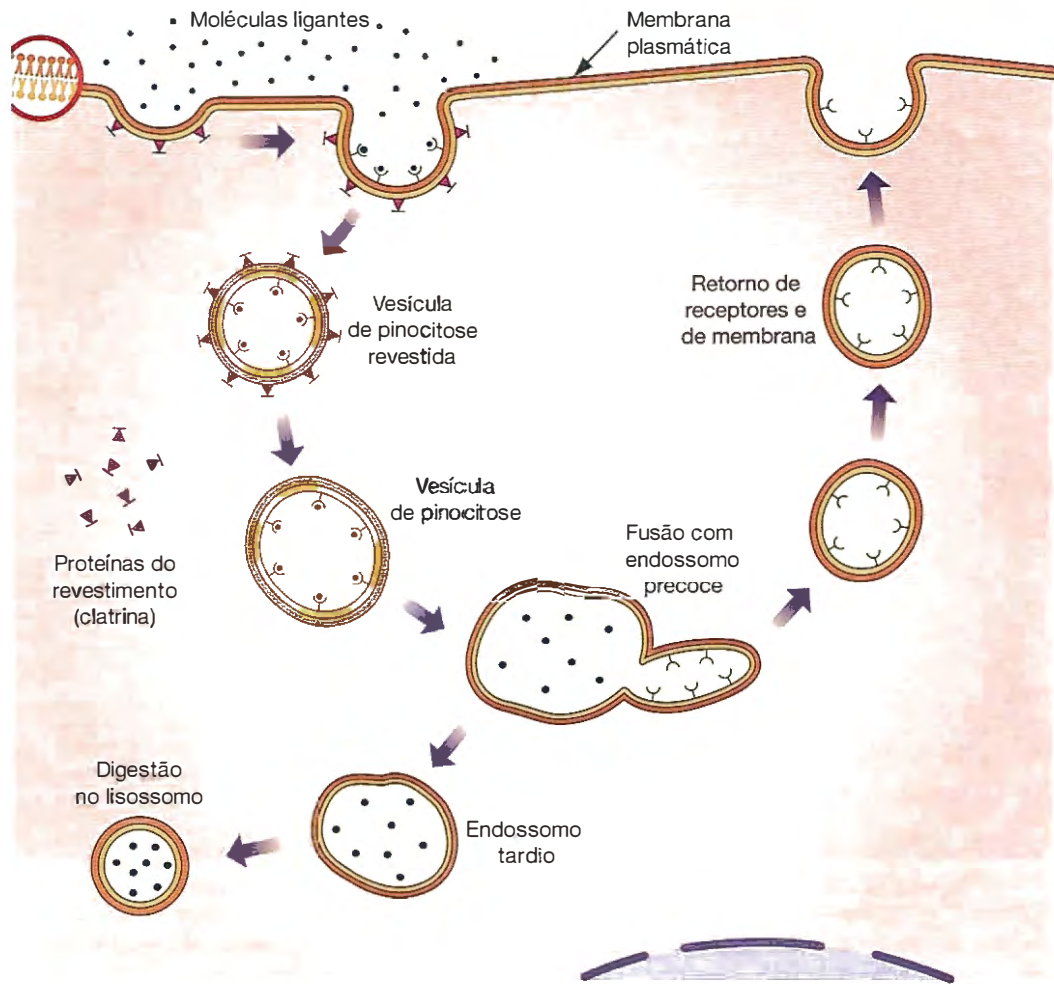



Figura 5.17 ▪ Esquema da via endocítica e da reciclagem de membrana plasmática. Ligantes como hormônios, fatores de crescimento e outras moléculas se prendem a receptores específicos da membrana plasmática e são introduzidos no citoplasma por meio das vesículas revestidas de clatrina. Depois da liberação das moléculas de clatrina e proteínas a ela associadas, a vesícula de pinocitose se funde com componentes do compartimento endossomal, onde, devido ao baixo pH, o ligante se separa dos receptores. Estes se concentram em uma região especial do endossomo precoce e são devolvidos à superfície celular. Assim, tanto receptores como membrana plasmática são reciclados para serem novamente utilizados. Na etapa seguinte, o ligante pode ser encontrado nos lisossomos. Todos os deslocamentos de vesículas descritos se realizam pela atividade de proteínas motoras com a participação do citoesqueleto.

(Figura 5.9). No intestino, a função dos microvilos é aumentar a área da membrana a fim de facilitar o transporte dos nutrientes da cavidade ou luz intestinal para dentro das células. Posteriormente, os nutrientes passam das células para o tecido conjuntivo e, daí, para os vasos sanguíneos e linfáticos, distribuindo-se então por todo o organismo.

Os microvilos do epitélio intestinal são paralelos uns aos outros e formam uma camada muito regular na superfície intestinal, a borda estriada, visível ao microscópio óptico.

No rim, os microvilos são encontrados na superfície livre da camada única de células cúbicas que revestem os túbulos contorcidos proximais. Pela luz desses túbulos passa um filtrado do plasma sanguíneo que origina a urina, mas que ainda contém muitas moléculas aproveitáveis. Nos túbulos contorcidos proximais, muitas dessas moléculas são removidas do filtrado, passando para as células dos túbulos, de onde são posteriormente devolvidas ao sangue. Os microvilos dessas células são também organizados paralelamente entre si, formando uma borda estriada visível ao microscópio óptico. Os microvilos das células renais, como todos os microvilos, só podem ser individualizados ao microscópio eletrônico.

A maioria das células tem microvilos, embora não tão numerosos e organizados como os das células absorventes. Os microvilos encontrados nas células em geral são pequenos, de forma irregular, contêm menor número de filamentos e se distribuem irregularmente por toda a superfície celular.

Além de aumentarem a superfície celular, alguns microvilos apresentam membranas que contêm moléculas especiais. Por exemplo, algumas enzimas da membrana das células do revestimento intestinal só existem nos microvilos, como as dissacaridases e dipeptidases, responsáveis pela etapa final da digestão de hidratos de carbono e proteínas, respectivamente.

Estereocílios são prolongamentos imóveis que aumentam a superfície de algumas células epiteliais

Os estereocílios são expansões longas e filiformes da superfície livre de determinadas células epiteliais (Figura 5.19). São flexuosos e, apesar do nome, não têm a estrutura nem a capacidade de movimento dos cílios verdadeiros.

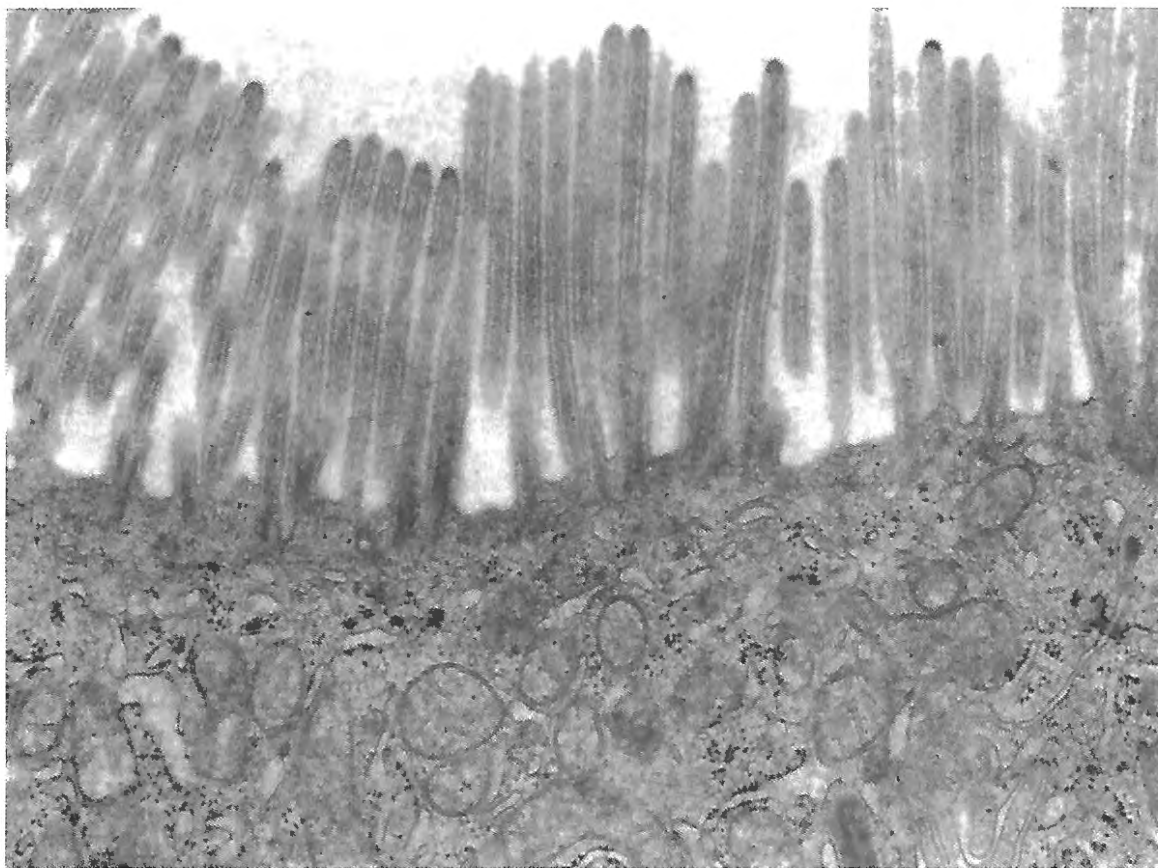



Figura 5.18 ▪ Microvilos de células epiteliais do intestino delgado. Eletromicrografia. Aumento: 25.000×.

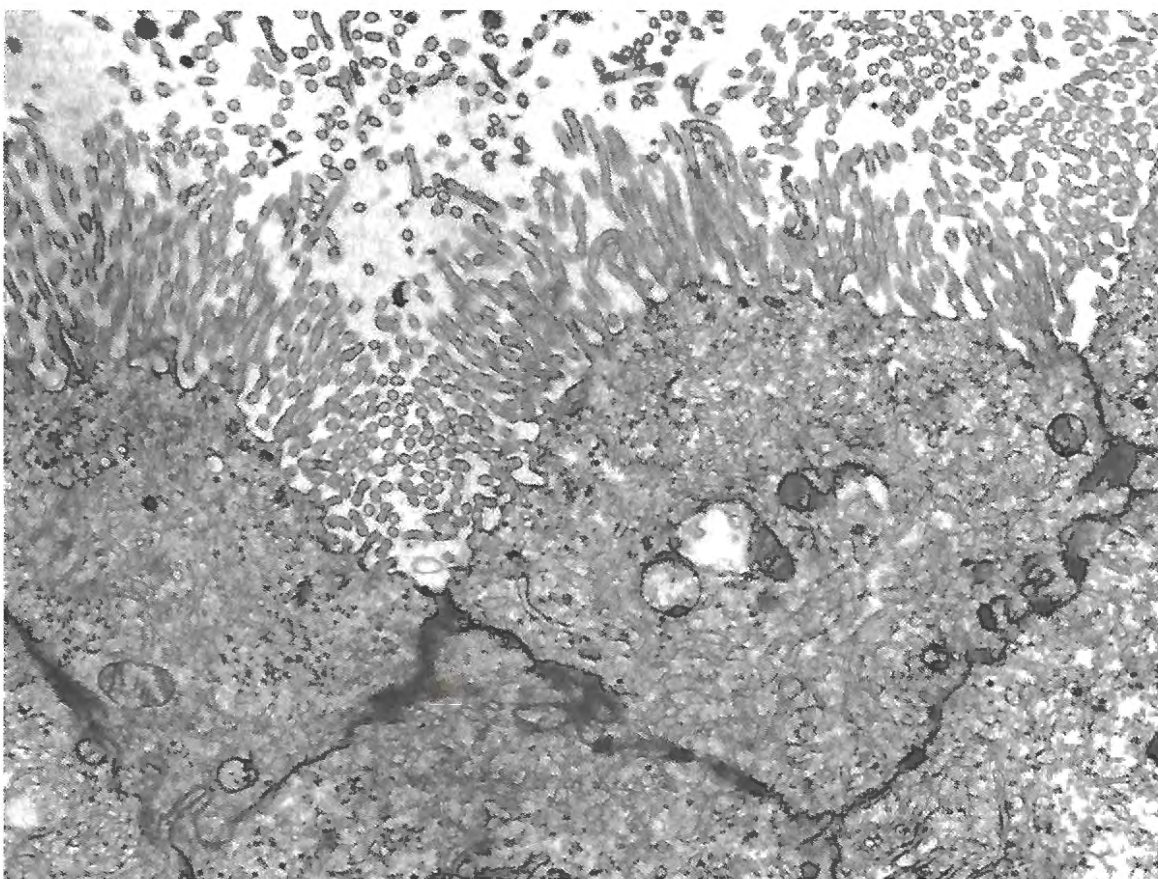



Figura 5.19 ▪ Estereocílios. Células epiteliais do epidídimo. Note que os estereocílios são flexuosos e, por isso, aparecem principalmente em cortes oblíquos. Eletromicrografia. Aumento: 12.000×.

Os estereocílios assemelham-se mais aos microvilos, destes se distinguindo por se ramificarem frequentemente e apresentarem maior comprimento. Enquanto os microvilos são frequentes em muitos tipos de células, os estereocílios são encontrados apenas em determinadas células epiteliais, como as que revestem o epidídimo e outros ductos do aparelho genital masculino. Os estereocílios aumentam muito a superfície das células, facilitando o transporte de água e outras moléculas.

Aderência entre as células por meio das CAM, glicoproteínas transmembrana

Já foi mencionado, neste capítulo, que as células se reconhecem e podem ligar-se umas às outras. Essa propriedade é importante nos mecanismos de desenvolvimento embrionário e no estabelecimento e na manutenção da estrutura dos tecidos, desde os animais mais primitivos até a espécie humana. As células também aderem à matriz extracelular, assunto que será explicado no Capítulo 12.

As glicoproteínas da membrana responsáveis pela aderência entre as células são denominadas CAM (*cell adhesion molecules*). As CAM são receptores da superfície especializados em reconhecer outras células e a elas aderir, para constituir os tecidos e órgãos. Frequentemente, as células respondem à união das CAM com pequenas modificações de comportamento, muitas vezes ocorrendo redução na frequência de mitoses. A inibição por contato nas células em cultura, já descrita, é um exemplo.

Todas as CAM são glicoproteínas integrais transmembrana, isto é, com uma extremidade da molécula exposta na superfície celular e a outra extremidade provocando saliência no lado citoplasmático da membrana.

As IgCAM constituem um grupo importante e suas moléculas lembram as dos anticorpos ou imunoglobulinas (Ig). Entre as IgCAM podem ser mencionadas a C-CAM, encontrada na superfície dos hepatócitos (células do fígado), a Ng-CAM, dos neurônios e células da glia (a glia ou neuróglia é constituída de células que apoiam, isolam eletricamente e têm outras funções relacionadas com a atividade do tecido nervoso), a N-CAM participa da adesão dos neurônios e a I-CAM encontrada em diversos tipos celulares. A I-CAM dos leucócitos (glóbulos brancos do sangue) participa da aderência temporária dos leucócitos com as células endoteliais dos vasos sanguíneos, como parte do processo inflamatório. Note que, nesse caso, a aderência é transitória, ao contrário do que geralmente acontece nos tecidos, onde as CAM formam aderências duradouras. Também nos processos de cicatrização das feridas e na regeneração de tecidos, as CAM formam aderências transitórias, que se desmancham e refazem em um processo dinâmico relacionado com os deslocamentos celulares. O mesmo dinamismo acontece durante o desenvolvimento embrionário, para possibilitar os movimentos celulares necessários à formação da estrutura definitiva dos diversos tecidos e órgãos.

As caderinas constituem outro grupo de CAM, porém, ao contrário das IgCAM, são dependentes dos íons Ca^{2+}. As caderinas mantêm a adesão entre as células nas concentrações normais de Ca^{2+} no meio extracelular, mas perdem a adesividade quando a concentração desse íon é muito baixa.

Quando as células normais se transformam em células malignas, perdem a adesividade, separando-se umas das outras. As células malignas soltas são levadas pelo sangue ou pela linfa, produzindo tumores a distância, as metástases (Capítulo 16).

Mesmo as CAM de células normais podem participar de processos patológicos. Um exemplo é a afinidade do vírus da poliomielite pelos neurônios. Esses vírus se ligam a CAM de neurônios e, assim, penetram nessas células.

Estruturas especializadas asseguram a junção celular, a vedação do espaço intercelular e a comunicação entre células

Muitas vezes, as células acham-se unidas umas às outras e à matriz extracelular graças a estruturas juncionais, que serão descritas a seguir, e que podem ser divididas em três grupos: 1º, estruturas cuja função principal é unir fortemente as células umas às outras ou à matriz extracelular (desmossomos e junções aderentes); 2º, estrutura que promove a vedação entre as células (zônula oclusiva); e 3º, estrutura que estabelece comunicação entre uma célula e outra (nexos, junção comunicante ou *gap junction*).

Desmossomo

Cada desmossomo tem a forma de uma placa arredondada e é constituído pelas membranas de duas células adjacentes (Figura 5.20). No desmossomo, o espaço de 15 a 20 nm existente entre as membranas permanece inalterado, mas aí surge um material filamentoso ou granular mais denso aos elétrons (Figura 5.21). Nos desmossomos, nota-se uma camada amorfa, elétron-densa, na face citoplasmática de cada membrana, chamada placa do desmossomo. Nessa placa se inserem filamentos intermediários, que se aprofundam no interior da célula (Figura 5.21). Desse modo, os desmossomos são locais onde o citoesqueleto se prende à membrana celular, e, como as células aderem umas às outras, forma-se um elo de ligação do citoesqueleto de células adjacentes. A constituição molecular dos filamentos intermediários que se prendem aos desmossomos depende do tipo celular. Nas células epiteliais são constituídos de queratina, mas, nas células musculares do coração, são constituídos de vimentina.

A capacidade dos desmossomos para prender células adjacentes depende da presença de caderinas, proteínas transmembrana que exibem adesividade na presença de íons Ca^{2+}. Por isso, o desmossomo só tem poder de fixar as células quando a concentração de Ca^{2+} no espaço extracelular é normal. Baixas concentrações desse íon causam a separação das células.

Os desmossomos são muito frequentes nas células submetidas a trações, como as da epiderme, do revestimento da língua e esôfago, e as células do músculo cardíaco. Formam-se com muita facilidade nas células mantidas em cultura e desaparecem nas que sofrem transformação maligna (células cancerosas), tanto *in vivo* como nas culturas.

A composição molecular dos desmossomos é complexa, com a participação de diversas proteínas, como as desmoplaquinas I e II, glicoproteínas encontradas nas placas. Os filamentos intermediários ligam-se às desmoplaquinas por meio de outras proteínas como a desmocalmina e a queratocalmina. As glicoproteínas

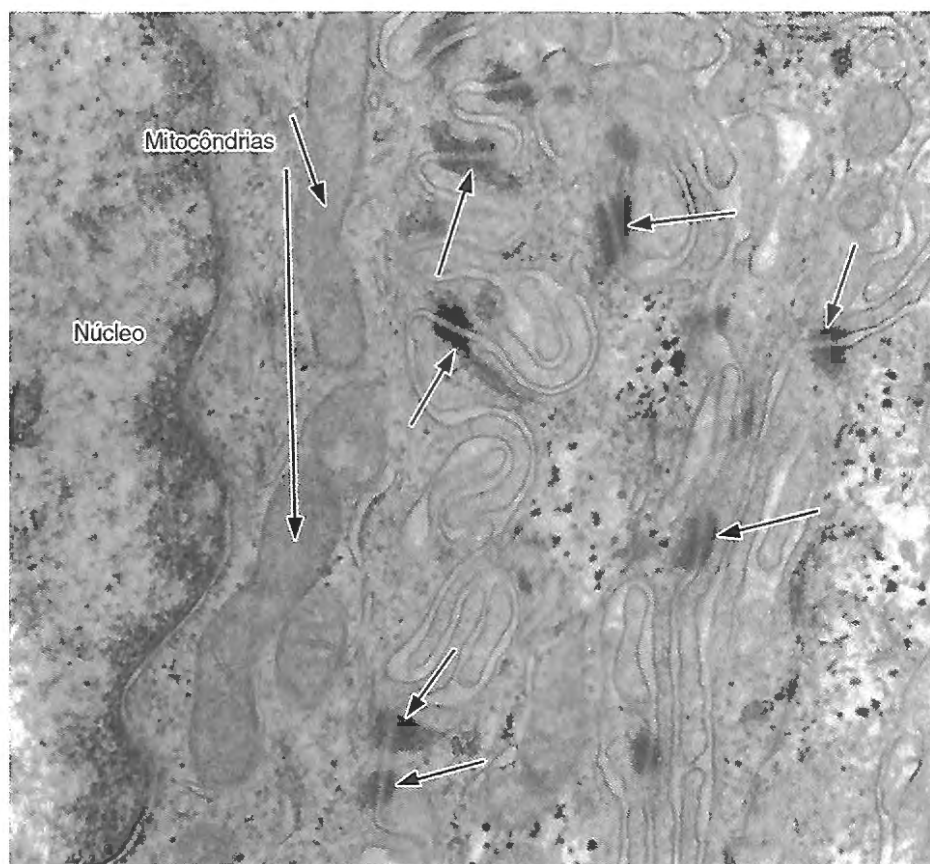



Figura 5.20 ▪ Eletromicrografia de interdigitações que prendem as células da epiderme umas às outras. Aparecem também numerosos desmossomos (*setas*). Aumento: 36.000×.

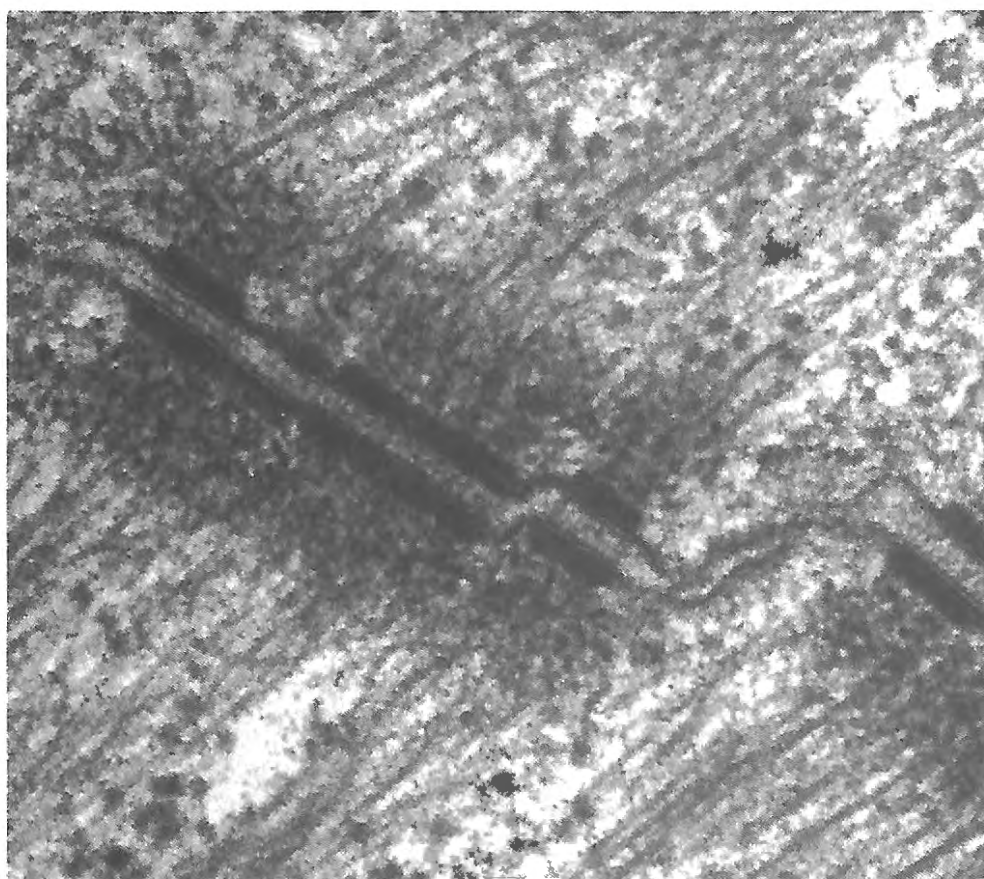



Figura 5.21 ▪ Desmossomo. Eletromicrografia de células epiteliais de revestimento. Observe também os numerosos tonofilamentos (um tipo de filamento intermediário, constituído de queratina) no citoplasma das duas células. Aumento: 100.000×.

desmogleína e desmocolinas são caderinas, glicoproteínas integrais da membrana, que prendem as membranas celulares na altura do desmossomo e também contribuem para a estrutura da placa. A desmogleína e as desmocolinas são proteínas transmembrana que provocam saliência tanto na superfície externa como na superfície citoplasmática da membrana.

As células dos epitélios apoiam-se em uma membrana não celular, chamada lâmina basal, que separa o epitélio do tecido conjuntivo. A face das células epiteliais em contato com a lâmina basal apresenta estruturas parecidas com os desmossomos, porém denominadas hemidesmossomos por não terem a metade correspondente à outra célula epitelial (Figura 5.22). Apesar de seu aspecto morfológico semelhante a meio-desmossomo, os hemidesmossomos apresentam diferenças moleculares em relação aos desmossomos. Os hemidesmossomos contêm desmoplaquinas, mas não contêm desmogleína, aderindo às lâminas basais por meio de moléculas proteicas da classe das integrinas (Capítulo 12).

Existe um grupo de doenças da pele humana, onde aparecem bolhas, denominadas genericamente de pênfigo. Em determinados tipos de pênfigo, detectou-se no sangue dos pacientes anticorpos contra caderinas dos desmossomos. Nesses casos, a desorganização dos desmossomos, pela alteração de suas proteínas, causa o afastamento das células da epiderme e a penetração de líquido vindo do tecido conjuntivo subjacente. Os desmossomos de outros tecidos que não a epiderme não mostram alterações nesses doentes, sugerindo que existem diferenças nas proteínas que constituem os desmossomos de células diferentes.

Junção aderente

É uma formação encontrada em diversos tecidos. Em determinados epitélios de revestimento, circunda a parte apical das células, como um cinto contínuo (zônula aderente), sendo particularmente desenvolvida no epitélio colunar simples com borda estriada da mucosa do intestino. Além da forma de cinto, a junção aderente ocorre também com a forma circular ou oval, como os desmossomos. A junção aderente apresenta, nos cortes, um material granular e elétron-denso no espaço intercelular, semelhante ao observado nos desmossomos. Na altura da junção aderente existe deposição de material amorfo na face citoplasmática de cada membrana celular, formando placas, onde se inserem filamentos de actina que fazem parte do citoesqueleto e são contráteis. Todavia, o material amorfo que forma as placas das junções aderentes é menos compacto do que o observado nas placas dos desmossomos.

As junções aderentes, como os desmossomos, também são sensíveis aos níveis de íons Ca^{2+}, sendo desorganizadas quando a concentração desses íons é muito baixa, o que acarreta a separação das células.

No caso das células colunares do epitélio intestinal, a junção aderente promove a adesão entre as células e oferece um local de apoio para os filamentos que penetram nos microvilos das células epiteliais com borda estriada.

Zônula oclusiva

É uma faixa contínua em torno da porção apical de determinadas células epiteliais, que veda, total ou parcialmente, o trânsito de íons e moléculas por entre as células. Desse modo, as substâncias que passam pela camada epitelial o fazem através das células, sendo submetidas ao controle celular. Outra função da zônula oclusiva, também chamada junção oclusiva, é permitir a existência de potenciais elétricos diferentes, consequência de diferenças na concentração iônica entre as duas faces da camada epitelial. Isso seria impossível se houvesse passagem livre de íons por entre as células. Trata-se, assim, de

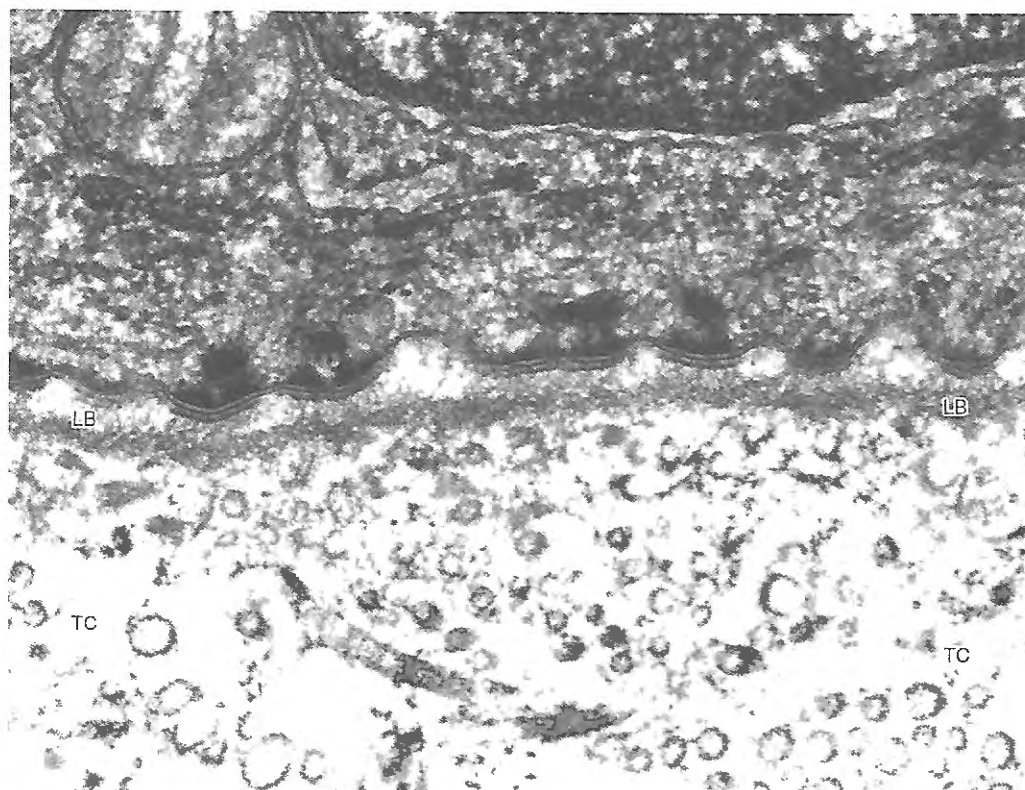



Figura 5.22 ▪ Eletromicrografia da parte basal de uma célula epitelial de revestimento, em contato com o tecido conjuntivo (TC). Aparecem diversos hemidesmossomos unindo a célula ao tecido conjuntivo, através da lâmina basal (LB). Existe material filamentoso prendendo cada hemidesmossomo à lâmina basal. Pele de camundongo. Aumento: 80.000×.

Figura 5.23 ▪ Microscopia eletrônica de réplica de célula do revestimento do intestino delgado preparada por criofratura. Na região da *zonula occludens*, semelhante às junções oclusivas ou *tight junctions*, observa-se uma rede de saliências de uma lâmina da membrana (parte esquerda da figura) que correspondem às depressões vistas na parte esquerda da figura. Aumento: 68.000×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

uma estrutura responsável pela formação de compartimentos funcionalmente separados, muitas vezes constituídos por camadas epiteliais com junções oclusivas bem desenvolvidas.

A Figura 5.23 mostra a estrutura da zônula oclusiva. Em corte, ela aparece como uma região onde os folhetos externos das membranas plasmáticas das duas células adjacentes se fundem.

▪ Complexo juncional

Está presente em vários epitélios próximo à extremidade celular livre, sendo constituído dos seguintes elementos: zônula oclusiva, junção (ou zônula) aderente e uma fileira de desmossomos (Figuras 5.24 e 5.25). Alguns autores não incluem os desmossomos como parte do complexo juncional. O complexo

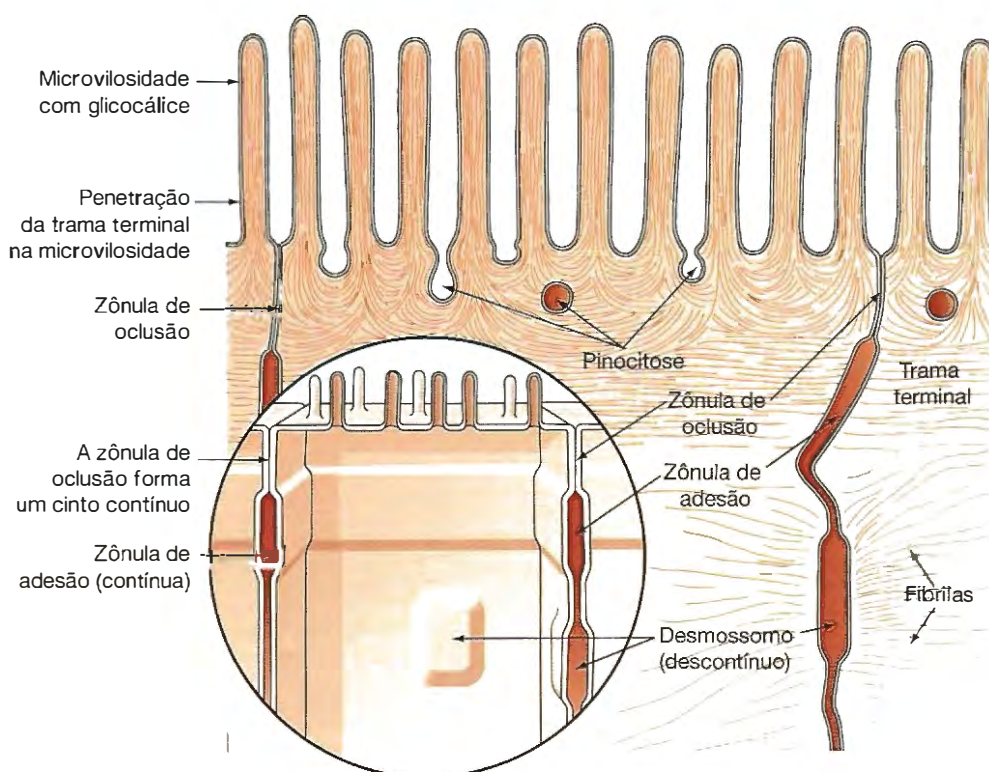



Figura 5.24 ▪ Esquemas do complexo juncional existente entre as células epiteliais do intestino delgado.

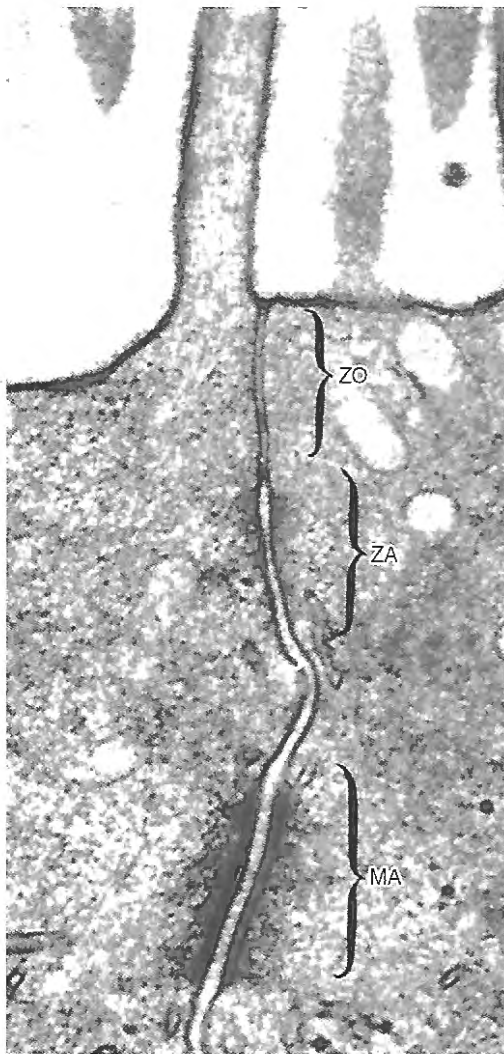



Figura 5.25 ▪ Eletromicrografia do complexo juncional. ZO, *zonula occludens;* ZA, *zonula adherens;* MA, ou D, *macula adherens* ou desmossomo. Aumento: 80.000×.

juncional é uma estrutura de adesão e vedação. Nas células do epitélio colunar simples com borda estriada do intestino, existe, na altura do complexo juncional, uma condensação de filamentos contendo actina, miosina e outras proteínas, que recebe o nome de trama terminal. Os filamentos da trama terminal se inserem na zônula de adesão e se continuam com os filamentos que penetram nos microvilos da borda estriada. Os filamentos da trama terminal são contínuos também com os filamentos do resto do citoplasma, participando assim do citoesqueleto.

▪ *Junção comunicante*

Também chamada nexos, junção em hiato ou *gap junction* (Figura 5.26), é de ocorrência muito frequente, tendo sido observada entre as células epiteliais de revestimento, epiteliais glandulares, musculares lisas, musculares cardíacas e nervosas. Trata-se de uma estrutura cuja função principal é estabelecer comunicação entre as células, permitindo que grupos celulares funcionem de modo coordenado e harmônico, formando um conjunto funcional.

Na junção comunicante, as membranas das células estão separadas por 2 nm apenas. Cada junção – em geral com a forma circular – é constituída por um conjunto de tubos proteicos paralelos que atravessam as membranas das duas células. Cada tubo é formado pela aposição de dois tubos menores, os conexons, pertencentes a cada uma das células adjacentes. O conexon é constituído por 6 unidades proteicas. O diâmetro do tubo é de 7 nm e seu poro ou canal, hidrofílico, é da ordem de 1,0 a 1,4 nm, o que permite a passagem de moléculas de até 1.200 dáltons.

Por meio das junções comunicantes podem passar de célula para célula, por distâncias apreciáveis, substâncias naturais diversas como nucleotídios, aminoácidos e íons. Todavia, os poros das junções comunicantes não permitem a passagem

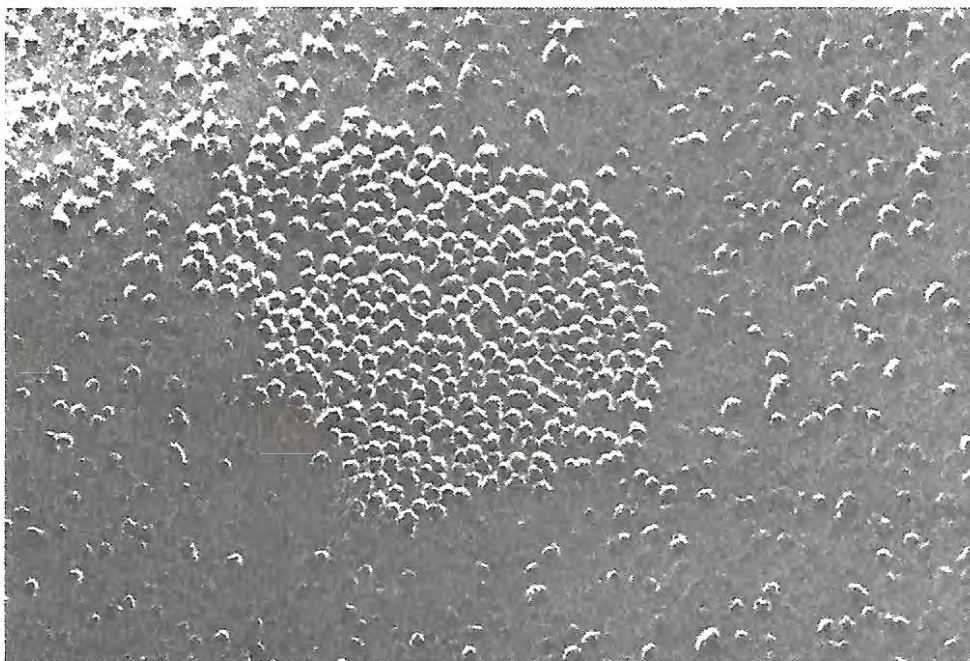



Figura 5.26 ▪ Micrografia eletrônica da réplica de uma junção comunicante criofraturada, que mostra a face *P* da membrana de uma das células. Observe que há um acúmulo de partículas globulares aderentes à face *P* da membrana. A face *E*, que não aparece nesta figura, contém depressões onde se encaixam as partículas da face *A*. Preparado de célula trofoblástica de embrião de rato. Aumento: 190.000×. (Cortesia de A. Martinez Palomo.)

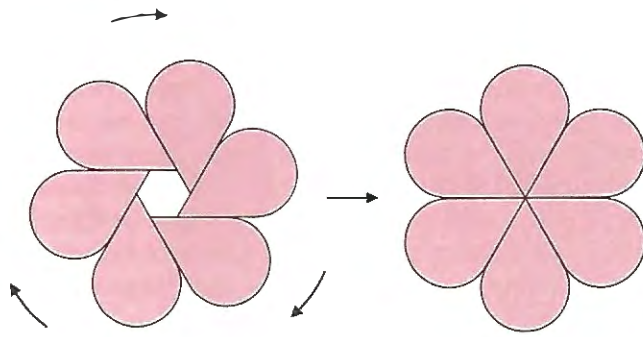



Figura 5.27 ▪ O desenho esquemático mostra o modelo da junção comunicante ou *gap junction*, no seu estado aberto (*à esquerda*) e no estado completamente fechado (*à direita*). Há um deslizamento das moléculas proteicas da junção, que fecha o orifício central pelo qual as células contíguas se comunicam.

de macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Foi demonstrado que o AMP cíclico (um mensageiro intracelular) produzido em uma célula em resposta à ação hormonal passa pelas junções comunicantes, promovendo resposta nas células adjacentes. Isso evidencia que essas junções podem coordenar e ampliar a resposta de grupos celulares a estímulos fisiológicos. As junções comunicantes podem passar de um estado de pouca permeabilidade a um estado de grande permeabilidade e, desse modo, abrem ou fecham a comunicação entre as células (Figura 5.27).

Onde se originam as moléculas que constituem as membranas celulares?

Os diversos sistemas de membranas intracelulares e a membrana plasmática, com suas especializações, são formados por diversos tipos de moléculas lipídicas, principalmente fosfolipídios, e por uma grande variedade de proteínas. Essas proteínas têm funções enzimáticas, receptoras, de aderência e outras indispensáveis para as atividades funcionais das membranas.

Os lipídios são sintetizados no retículo endoplasmático liso e a transferência das moléculas lipídicas ocorre por mais de um mecanismo. Essas moléculas podem migrar, partindo da membrana do retículo endoplasmático liso para membranas que sejam contínuas com as desse retículo. É por esse processo que os lipídios passam do retículo liso para o rugoso. Muito frequentemente, a transferência se dá por meio de vesículas que se destacam do retículo liso ou rugoso e são levadas por proteínas motoras apoiadas no citoesqueleto para outros compartimentos, com os quais se fundem. Outro meio de transferência é representado por proteínas especiais do citosol que se combinam com moléculas lipídicas do retículo liso e as transferem para a membrana de outros compartimentos. Um exemplo é o transporte de moléculas de fosfolipídios da membrana do retículo liso para a membrana dos peroxissomos.

As proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e, geralmente, são transportadas por vesículas que passam pelo aparelho de Golgi (Figura 5.28). Assim, as proteínas chegam à membrana plasmática, e a extremidade da molécula proteica, que estava dentro da vesícula, passa para a superfície da célula.

Ao lado da movimentação das novas moléculas sintetizadas, existe um intercâmbio de moléculas da membrana plasmática, quando ocorre a endocitose. Muitas moléculas

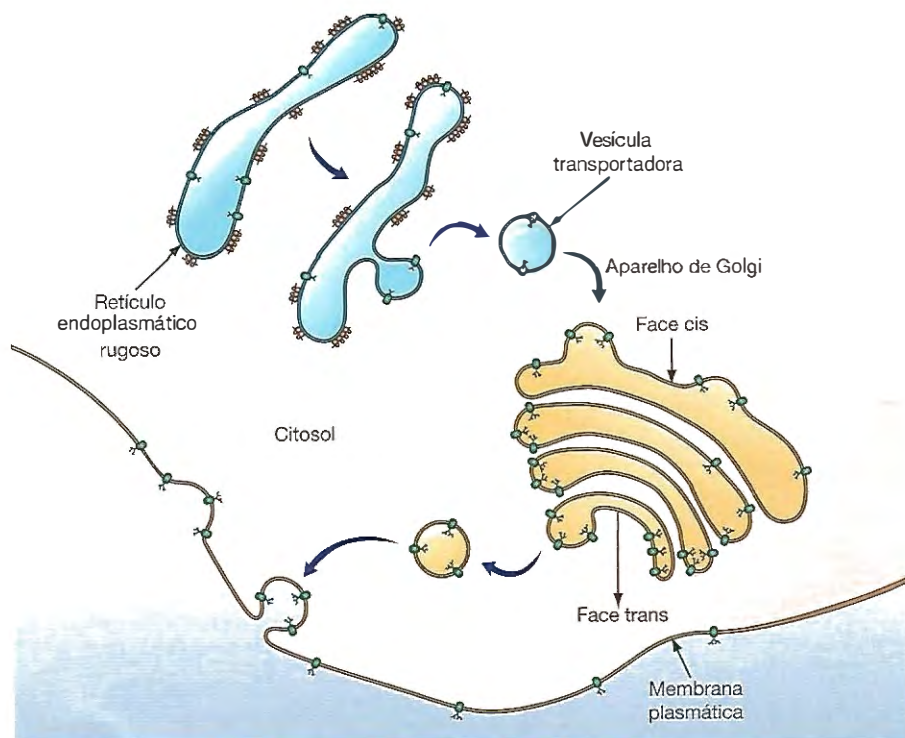



Figura 5.28 ▪ As proteínas da membrana plasmática são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso. O exemplo mostra moléculas de glicoproteínas, cuja cadeia glicídica se inicia no retículo, sendo aumentada no aparelho de Golgi. Note que a vesícula que leva as moléculas de glicoproteínas leva também os fosfolipídios onde elas estão inseridas. Observe, ainda, que o interior da vesícula e as cisternas do aparelho de Golgi e do retículo endoplasmático são equivalentes à superfície externa da célula. A cadeia glicídica, inicialmente localizada no interior dos compartimentos mencionados, passa para a face externa da membrana plasmática.

que chegam à membrana plasmática levadas por vesículas são moléculas recicladas, e não, necessariamente, moléculas novas. Há um fluxo de moléculas transportadas por vesículas nos dois sentidos: da membrana plasmática para o interior da célula e de compartimentos citoplasmáticos para a membrana plasmática.

Resumo

Pela atividade da membrana plasmática, as células mantêm estável a composição molecular e iônica do meio intracelular, transferindo para fora as moléculas e íons desnecessários e introduzindo no citoplasma aquilo que a célula necessita. A membrana contém macromoléculas proteicas específicas com grande afinidade para moléculas produzidas por outras células e que servem como sinais químicos de comunicação. Isso possibilita a vida das células em sociedade, formando organismos complexos.

Todas as membranas celulares têm estrutura molecular básica semelhante. São constituídas por uma bicamada lipídica, com moléculas proteicas inseridas e provocando saliências em uma face ou nas duas faces da membrana. Nas condições de temperatura do corpo, a membrana é um fluido lipoproteico, gozando as moléculas proteicas de grande mobilidade lateral, no plano da membrana, porém sem mobilidade em outra direção. Existe nítida assimetria entre as duas faces das membranas. Na membrana plasmática, a face externa é rica em glicoproteínas receptoras, enquanto a face interna, no lado citoplasmático, tem proteínas que se ligam de modo reversível aos filamentos do citoesqueleto. Açúcares ligados a proteínas, a glicosaminoglicanas e a lipídios da face externa da membrana formam uma camada contínua, de espessura variável, em volta das células: o glicocálice. Este é uma parte integrante da membrana e se liga tanto a moléculas intracelulares como a moléculas do meio extracelular, estabelecendo continuidade entre o interior das células e o ambiente onde elas se localizam.

Muitas moléculas penetram nas células, sem consumo de energia, pelo processo de difusão passiva. Outras são transportadas ativamente, isto é, com gasto de energia. Existe ainda o processo de difusão facilitada, pelo qual a substância atravessa a membrana, sem consumo de energia, graças às moléculas de permeases.

A transferência de macromoléculas em quantidade para dentro da célula ou endocitose é feita por fagocitose, pinocitose não seletiva e pinocitose seletiva. O trânsito em sentido inverso – isto é, para fora da célula – tem o nome genérico de exocitose. Na pinocitose seletiva, as macromoléculas a serem transportadas se prendem a receptores da membrana. Forma-se então uma vesícula encapada que, ao se destacar da membrana, está revestida por uma malha de clatrina e outras proteínas.

As vesículas de endocitose podem-se fundir com lisossomos, organelas ricas em enzimas digestivas, que atacam as macromoléculas introduzidas nas células. Outra função dos lisossomos é digerir, nos autofagossomos, partes da célula que perderam o significado funcional. Algumas vezes, as enzimas lisossômicas são secretadas e vão digerir macromoléculas da matriz extracelular.

Muitas células animais apresentam expansões digitiformes da superfície: os microvilos ou microvilosidades, que aumentam muito a superfície celular, sendo numerosos nas células especializadas na absorção, como as do revestimento intestinal.

Na maioria dos tecidos, as células se prendem umas às outras por meio de modificações de suas membranas, conhecidas coletivamente como junções celulares. Muitas vezes, a função principal dessas estruturas é apenas a aderência entre as células, como acontece com os desmossomos; outras vezes, seu papel é vedar o espaço intercelular, impedindo o trânsito molecular extracelular de tal modo que a passagem tem que ser feita por via intracelular e, portanto, sob o controle das próprias células. A especialização da membrana para constituir essa estrutura de vedação chama-se zônula oclusiva ou zônula de oclusão. Há também, em alguns locais, modificações das membranas de células adjacentes para permitir a passagem de uma célula para a outra, de íons e moléculas pequenas, que transferem informações por meio desses sinais químicos, integrando a atividade de conjuntos celulares. Esses conjuntos apresentam acentuada unidade funcional, porque todas as células respondem aos estímulos (hormonais, nervosos) recebidos, mesmo que esses estímulos sejam captados por apenas algumas células do conjunto.

Bibliografia

Bennet, V.: The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Ann. Rev. Biochem.*, 54:273, 1985.

Beyer, E.C.: Gap junctions. *Int. Rev. Cytol.*, 137C:1, 1993.

Bock, G. and Clark, S. (eds.): *Junctional Complexes of Epithelial Cells. Ciba Symposium 125*. John Wiley, 1987.

Bockaert, J.: Les récepteurs membrainaires. *La Recherche*, **179** (juillet-août):892, 1986.

Bretscher, M.S.: Endocytosis: relation to capping and cell locomotion. *Science*, 224:681, 1984.

Bretscher, M.S.: The molecules of the cell membrane. *Sci. Amer.*, **253**:100, 1985.

Capaldi, R.: A dynamic model of cell membranes. *Sci. Amer*, **230**(3):27, 1974.

Cuatrecasas, P. and Greave, M.F. (ed.): *Receptors and Recognition*. Series A, vols. 1 and 2. Chapman and Hill, 1976.

Cuatrecasas, P.: Membrane receptors. *Ann. Rev. Biochem.*, **43**:169, 1974.

Dingle, J.T.: *Lysosomes in Biology and Pathology*, 5 vols. Elsevier/North-Holland, 1973-1978.

Finean, J.B.R., Coleman, R. and Michell, R.H.: *Membranes and their Cellular Functions*, 3rd ed. Blackwell, 1984.

Garrod, D.R.: Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. *J. Cell Sci. Suppl.*, 4:221, 1986.

Goldstein, J.L. *et al.*: Receptor-mediated endocytosis. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**:1, 1985.

Holtzman, E.: *Lysosomes*. Acad. Press, 1989.

Comunicações Celulares por meio de Sinais Químicos

Roteiro

- A comunicação entre as células é feita, principalmente, por meio de moléculas informacionais
- A troca de sinais químicos entre as células é essencial para: formação dos tecidos, multiplicação celular, fagocitose, síntese de anticorpos, atração de leucócitos para defesa, coordenação do metabolismo e muitas outras atividades celulares
- A molécula que constitui o sinal químico chama-se ligante
- A molécula celular que se combina com o ligante e desencadeia uma resposta na célula, chama-se receptor
- Didaticamente, os sinais podem ser divididos em três categorias: hormônios, secreção parácrina e secreção de neurotransmissores. Os sinais parácrinos podem influir sobre as células que os produziram (secreção autócrina)
- Nas junções comunicantes ou *gap junctions*, as células se intercomunicam diretamente. Há passagem de íons e moléculas pequenas por meio de canais entre células adjacentes
- Moléculas sinalizadoras (ligantes) iguais muitas vezes promovem respostas diferentes, de acordo com as células-alvo
- Um mesmo ligante pode atuar por caminhos diferentes: a epinefrina é um hormônio e, também, um neurotransmissor
- As moléculas sinalizadoras que são proteínas ou pequenos peptídios, ao se combinarem com receptores da membrana, acionam a maquinaria citoplasmática que produz mensageiros intracelulares, como Ca^{2+} e AMP cíclico (cAMP)
- Os hormônios esteroides e os da glândula tireoide penetram nas células e são captados por receptores intracelulares. Os esteroides são moléculas derivadas do colesterol
- O complexo constituído pelo receptor intracelular mais o hormônio prende-se ao DNA e influencia (geralmente estimulando) a transcrição gênica
- Entre os mediadores que atuam próximo ao local de produção (secreção parácrina) estão os derivados do ácido araquidônico da membrana celular
- Os principais mediadores derivados do ácido araquidônico, ou eicosanoides, são as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos.

Nos organismos multicelulares, a troca de informação por meio de moléculas, que são sinais ou mensageiros químicos, começa na vida embrionária e constitui, durante toda a vida, o principal meio de comunicação entre as células. Esses sinais são importantes para que os tecidos e órgãos se formem de modo ordenado e, após a estruturação do corpo, são necessários para coordenar o crescimento e o funcionamento das diferentes partes do organismo. Os mensageiros químicos influenciam o metabolismo, a multiplicação celular, a secreção, a fagocitose, a produção de anticorpos, a contração e muitas outras atividades celulares. Praticamente, todas as funções celulares e teciduais são reguladas por sinais químicos. Neste capítulo será realizada uma breve descrição do assunto, e serão apresentados alguns exemplos ilustrativos.

Esse sistema de comunicação atua por meio de moléculas sinalizadoras ou ligantes, que se prendem a locais específicos das moléculas receptoras ou receptores (Figura 6.1). Para se caracterizar como receptor, uma molécula deve ser capaz de reconhecer especificamente outra molécula (ligante) e de desencadear uma resposta celular, quando unida com o respectivo ligante. Didaticamente, distinguem-se três tipos de comunicação, que serão mencionados a seguir (Figura 6.2).

▸ **1º tipo.** Pela secreção de moléculas denominadas hormônios, que são, geralmente, secretados pelas glândulas endócrinas. Os hormônios são lançados no espaço extracelular, penetram nos capilares sanguíneos e se distribuem por todo o corpo, atuando à distância, nas chamadas células-alvo. Célula-alvo é aquela que tem receptor para o hormônio.

▸ **2º tipo.** Pela secreção de moléculas que atuam nas células adjacentes, sendo retidas pela matriz extracelular no local de produção ou, então, inativadas logo após exercerem suas funções. Nesse modo de comunicação, chamado comunicação parácrina, os sinais químicos atuam nas proximidades do local onde foram secretados. O usual é que a molécula secretada por um tipo celular atue sobre células de outro tipo. Contudo, na secreção parácrina, algumas vezes, as moléculas sinalizadoras produzidas por um tipo celular agem sobre células do mesmo tipo que estão próximas, atingindo também a própria célula que originou o sinal químico. A secreção que atua sobre o mesmo tipo de célula se chama secreção autócrina.

Figura 6.1 ▪ O desenho esquemático mostra que existe grande variedade de moléculas com potencial informacional no meio extracelular. Os receptores reconhecem, selecionam e interagem especificamente com determinadas moléculas, dentre as inúmeras que entram em contato com as células. Observe que as três células representadas no desenho têm receptores diferentes e, por isso, não reagem aos mesmos sinais.

▸ **3º tipo.** Pela secreção de moléculas chamadas neurotransmissores. Essa secreção tem lugar nas sinapses, que são locais especializados em que as células nervosas (ou neurônios), por meio de seus numerosos prolongamentos, estabelecem contato umas com as outras. Os neurotransmissores são liberados, também, pelos prolongamentos das células nervosas que fazem conexão com células musculares (Figuras 6.2 e 6.3) ou com células secretoras. O neurotransmissor atravessa um espaço muito pequeno, de apenas alguns nanômetros, entre o terminal do prolongamento nervoso (axônio) e a outra célula nervosa, a célula muscular ou a célula secretora, conforme o caso.

Além dos processos mencionados, que envolvem ligantes e receptores, algumas células se comunicam diretamente por meio de moléculas que passam por canais existentes entre células contíguas. Esses canais são constituídos por moléculas proteicas das membranas de duas células, em regiões chamadas junções comunicantes ou *gap junctions*, estudadas no Capítulo 5.

A resposta a um sinal químico pode variar conforme as características do receptor

A maioria das células do corpo dos animais contém um conjunto específico e geneticamente programado de receptores para os numerosos sinais químicos que ativam, ou inibem, as atividades celulares. As respostas das células diante dos diversos sinais dependem, basicamente, do elenco de receptores que cada célula recebeu durante sua diferenciação embrionária. A resposta da célula-alvo pode depender também de diferenças na estrutura molecular do receptor. Por exemplo, os receptores para acetilcolina são diferentes no músculo esquelético e no músculo cardíaco, e a acetilcolina estimula a contração dos músculos esqueléticos, mas diminui o ritmo e a força das contrações do músculo do coração (miocárdio). Contudo, na maioria das células, os receptores para determinado sinal são iguais, mas as respostas podem ser diferentes, indicando que a resposta, nesses casos, depende da maquinaria molecular intracelular à qual os receptores estão ligados.

Os hormônios geralmente são produzidos pelas glândulas endócrinas

As células produtoras de hormônios geralmente constituem órgãos especializados, as glândulas endócrinas. A comunicação hormonal é um processo relativamente lento, porque os hormônios levam algum tempo para se distribuírem pelo corpo, carregados pela corrente sanguínea (Figura 6.2). Depois de deixarem os capilares, por difusão, os hormônios são captados pelas células que contêm receptores específicos. A especificidade dos hormônios depende não somente de sua natureza

Figura 6.2 ▪ Os desenhos esquemáticos mostram os três tipos principais de comunicação entre as células por meio de moléculas específicas (sinais químicos). **A.** Comunicação pela secreção de hormônio, que é transportado pelo sangue e atua, à distância, sobre as células que contêm receptores com afinidade para o hormônio (células-alvo). **B.** Comunicação do tipo parácrino, que se caracteriza, principalmente, pelo fato de que as moléculas informacionais, secretadas no meio extracelular, atuam sobre células próximas. As moléculas secretadas atravessam apenas alguns milímetros, no máximo alguns centímetros, até atingirem as células-alvo (células com receptores para a molécula sinalizadora). **C.** Comunicação por neurotransmissores. Nesse tipo de comunicação, a molécula neurotransmissora é liberada a uma distância de apenas 20 nm da célula que recebe a informação. Os receptores da célula captadora se localizam exclusivamente na área da membrana em frente ao terminal do axônio, que é a parte final, dilatada, desse prolongamento neuronal.

química, mas também da existência de receptores apropriados nas células-alvo. Cada tipo de célula endócrina geralmente secreta um hormônio, e as células que contêm receptores para esse hormônio reagirão de uma maneira correspondente à natureza da célula-alvo (Figura 6.4). Por exemplo, a resposta pode ser a liberação de secreção, ou a inibição da atividade secretória, conforme o hormônio e conforme o tipo de célula-alvo. Como os hormônios se diluem muito, no sangue e no fluido extracelular, é indispensável que os receptores os fixem com grande afinidade.

As células neuroendócrinas do hipotálamo são importantes para a coordenação do sistema endócrino

Nos vertebrados, existe uma ligação dos sistemas nervoso e endócrino em uma região do cérebro chamada hipotálamo. O hipotálamo se comunica com a hipófise pelo pedículo hipofisário. Esse pedículo é formado por vasos sanguíneos e numerosas extensões (axônios) de células nervosas (neurônios)

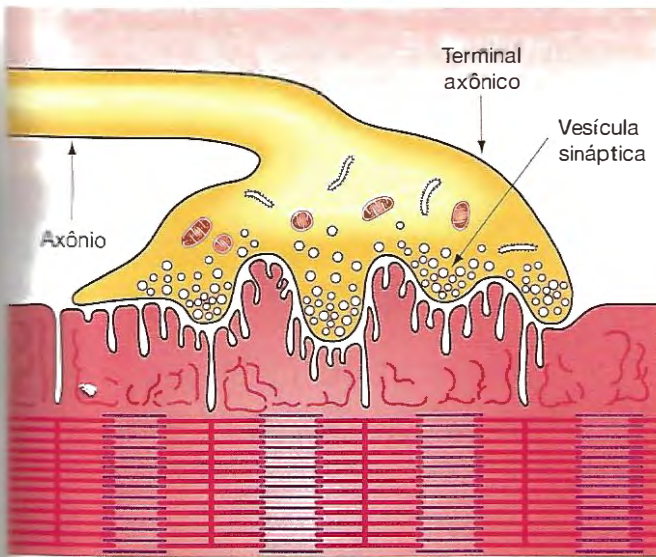



Figura 6.3 • Comunicação intercelular por neurotransmissor. O desenho mostra um terminal axônico (*em cima*) sobre uma fibra muscular estriada (*embaixo*). O axônio exibe, em corte, muitos microtúbulos e filamentos intermediários. O terminal axônico tem mitocôndrias, cisternas do retículo endoplasmático rugoso e numerosas vesículas, chamadas vesículas sinápticas, contendo o neurotransmissor acetilcolina. A parte pregueada da membrana da fibra muscular contém grande quantidade de receptores para acetilcolina (não mostrados no desenho). Observe que o espaço entre a membrana plasmática do terminal axônico e a fibra muscular é muito pequeno; esse espaço, chamado fenda sináptica, mede apenas 20 nm.

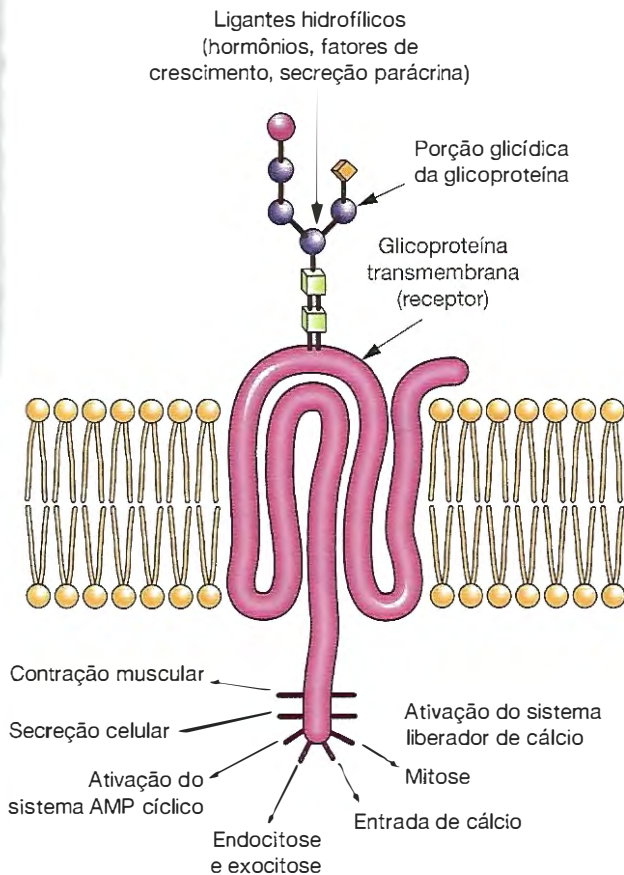



Figura 6.4 • O desenho esquemático mostra como moléculas hidrofílicas afetam as funções celulares agindo sobre receptores (glicoproteínas) da membrana plasmática. As moléculas mensageiras (ligantes) hidrofílicas geralmente são de natureza proteica. Os fatores (ligantes) de natureza lipídica, como os hormônios esteroides, agem sobre receptores intracelulares. Cerca de 80% dos sinais químicos, aos quais as células estão sujeitas normalmente, são hidrofílicos. Observe, na parte inferior do desenho, a variedade de respostas, que depende das características da célula-alvo.

localizadas no hipotálamo. São células nervosas que secretam hormônios e, por isso, chamadas de células neuroendócrinas. Assim, no hipotálamo e na hipófise existe uma associação funcional entre o sistema nervoso e o endócrino, associação essa que influencia numerosas funções do organismo. Células neuroendócrinas do hipotálamo respondem a estímulos recebidos de outras células nervosas, secretando hormônios que são liberados no pedículo hipofisário, penetram nos numerosos capilares sanguíneos lá existentes e estimulam, ou inibem, a atividade secretora das células da parte anterior da hipófise. Outros axônios, também originados de células neurossecretoras do hipotálamo, são mais longos e constituirão a neuro-hipófise. Esses axônios conduzem e liberam, na neuro-hipófise, os hormônios antidiurético (ADH) e ocitocina. O hormônio antidiurético diminui a eliminação de água pelos rins e a ocitocina estimula a contração da musculatura lisa do útero no momento do parto.

Algumas respostas a hormônios são imediatas; porém, duram pouco

Por exemplo, o aumento da concentração de glicose no sangue estimula as células B do pâncreas endócrino a secretarem insulina, uma proteína muito solúvel no plasma sanguíneo. Em poucos minutos, a insulina se distribui pelo corpo, estimulando a captação de glicose, principalmente pelas células adiposas e pelas células musculares, fazendo reduzir a níveis normais a concentração sanguínea de glicose. A resposta, nesse caso, é rápida porque, nas células B do pâncreas endócrino, existe constantemente insulina pronta para ser liberada, e existe uma reserva de receptores para insulina e de moléculas transportadoras de glicose na membrana plasmática das células musculares e adiposas (Figura 6.5). A combinação da insulina com os respectivos receptores ativa a penetração de glicose no citoplasma, no qual ela será armazenada nas moléculas de glicogênio, que é um polímero da glicose e constitui uma reserva nutritiva para as células animais.

Hormônios lipossolúveis têm ação mais prolongada

Embora a grande maioria dos hormônios seja hidrossolúvel e atue sobre receptores situados na membrana plasmática, alguns são lipossolúveis, atravessam a membrana celular com facilidade e se fixam a receptores localizados no citoplasma e no núcleo das células-alvo. São exemplos os hormônios esteroides e os hormônios da glândula tireoide, tiroxina ou tetraiodotironina (T4) e tri-iodotironina (T3). Os hormônios esteroides e os da tireoide são transportados no plasma sanguíneo ligados a proteínas transportadoras, mas, no momento de atravessar a membrana plasmática, as proteínas transportadoras são separadas dos hormônios, e somente estes atravessam a membrana celular.

São exemplos de hormônios esteroides o hormônio sexual masculino (testosterona), os femininos (estrógenos e progesterona) e os corticosteroides, hormônios produzidos pela camada cortical da glândula adrenal.

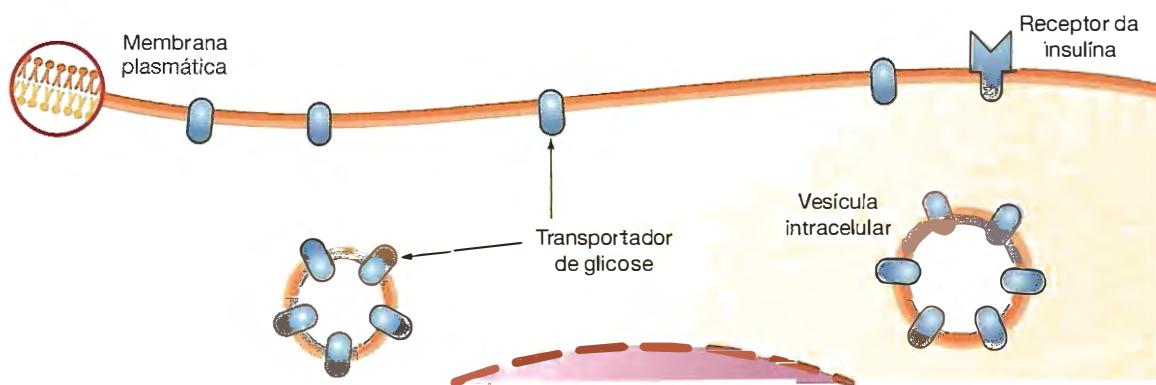
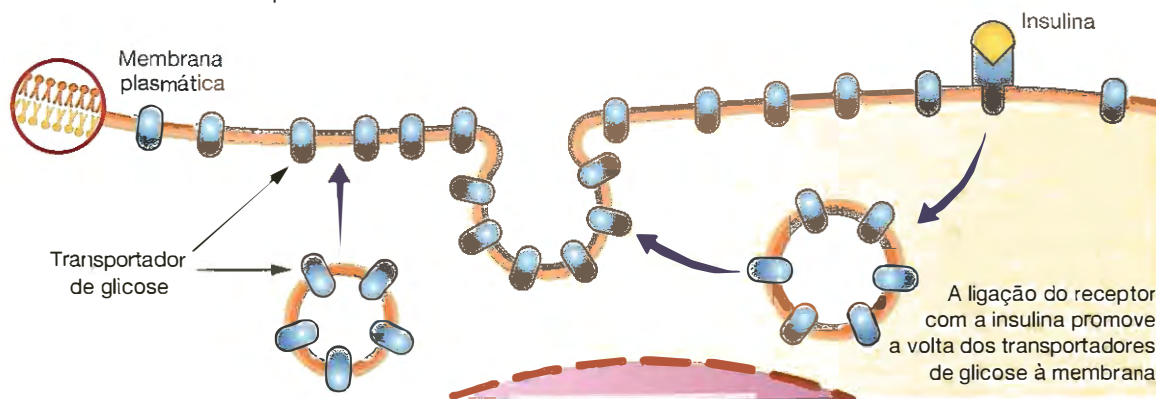
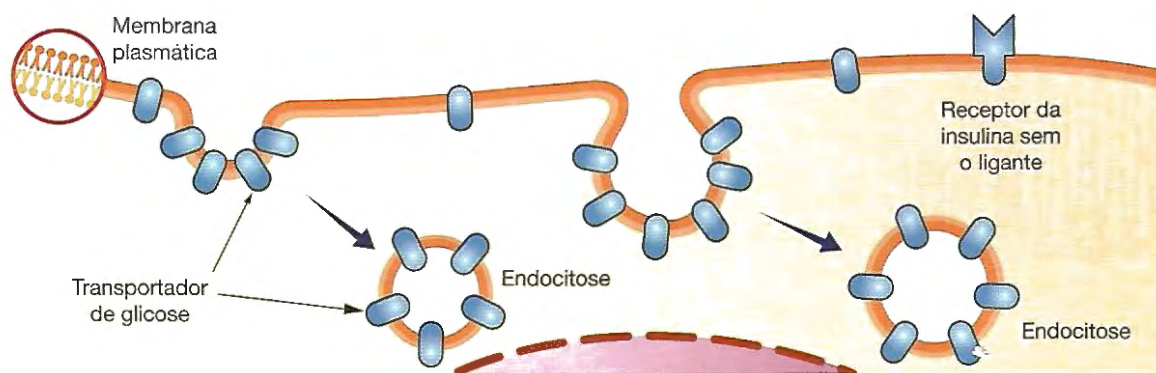



Figura 6.5 ▪ O desenho esquemático mostra alguns aspectos do estímulo produzido nas células-alvo pela insulina, principal hormônio regulador do teor de glicose no sangue. A insulina estimula a penetração da glicose nas células, onde ela é depositada sob a forma de glicogênio, importante reserva energética. Consequentemente, a insulina faz baixar a concentração de glicose no sangue. **A.** Célula não estimulada, aparecendo o receptor para insulina inserido na membrana plasmática e diversas vesículas intracitoplasmáticas contendo uma reserva de moléculas transportadoras de glicose. A quantidade dessas moléculas na membrana plasmática é relativamente pequena, o que diminui a capacidade de transporte de glicose para o interior da célula. **B.** A combinação da insulina com seu receptor (*à direita do desenho*) estimula a transferência das vesículas que contêm o transportador de glicose para a membrana plasmática, aumentando a capacidade de captação de glicose, em razão do aumento do número de transportadores na membrana plasmática. **C.** A remoção da insulina estimula a endocitose dos transportadores de glicose, que voltam à sua localização intracelular, onde permanecem como reserva para uso posterior, quando o receptor de insulina recebe novamente o estímulo hormonal.

Outra diferença entre os hormônios hidrossolúveis e os lipossolúveis diz respeito ao tempo de permanência no sangue e nos fluidos teciduais. Geralmente, os hormônios hidrossolúveis são eliminados do sangue poucos minutos após serem secretados. Ao contrário, os hormônios esteroides persistem no plasma sanguíneo durante horas, e os hormônios da tireoide por tempo ainda mais longo, muitas vezes durante alguns dias. Isso significa que os hormônios lipossolúveis tendem a mediar respostas mais prolongadas.

Mecanismo de ação dos hormônios que atuam por intermédio de receptores da membrana

Todos os hormônios hidrossolúveis são captados por receptores localizados na membrana plasmática das células-alvo (Figura 6.4). Alguns, como os receptores para insulina, são denominados catalíticos, porque, quando ativados, funcionam como enzimas, geralmente quinases proteicas (quinases proteicas são enzimas que atuam sobre proteínas) que fosforilam a hidroxila da tirosina de proteínas citoplasmáticas específicas.

Contudo, a maioria das moléculas sinalizadoras hidrossolúveis age sobre receptores que atuam por intermédio de uma cadeia de moléculas, que modifica os níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP) ou Ca^{2+}. AMP cíclico e Ca^{2+} são denominados mediadores ou mensageiros intracelulares (Figura 6.6).

Quando as células musculares ou hepáticas são expostas ao hormônio epinefrina (produzido pela camada medular da glândula adrenal), por exemplo, há um aumento no teor intracelular de cAMP que ativa a enzima fosforilase glicogênica. Essa enzima promove a hidrólise do glicogênio armazenado nas células, formando-se glicose. Para que o cAMP funcione adequadamente como um mediador intracelular, é preciso que ele seja sintetizado e degradado rapidamente; do contrário, sua atuação permaneceria por tempo excessivo. AMP cíclico é produzido a partir de ATP pela enzima adenilato-ciclase, que se encontra presa à membrana celular. A destruição do cAMP deve-se às cAMP fosfodiesterases que hidrolisam o cAMP, produzindo adenosina-5′-monofosfato (5′-AMP).

A mesma molécula sinalizadora pode aumentar ou diminuir o nível intracelular de cAMP, conforme o tipo de receptor presente na célula-alvo. Por exemplo, os receptores beta-adrenérgicos, ao receberem moléculas de epinefrina, aumentam o teor intracelular de cAMP, enquanto os receptores α_2-adrenérgicos diminuem o teor de cAMP ao captarem epinefrina.

Quando vários ligantes atuam sobre uma célula cuja membrana apresenta receptores específicos para todos eles, a resposta é menor do que seria de esperar da soma dos estímulos recebidos. A explicação reside no fato de que a maquinaria produtora de mensageiros intracelulares não é capaz de atender a todos os receptores simultaneamente. Os receptores compartilham essa maquinaria, sendo deslocados, na bicamada lipídica, para atuar sobre os componentes intracelulares produtores de mensageiros. Nessa movimentação, os receptores são impulsionados pelos filamentos do citoesqueleto.

A concentração de íons cálcio na matriz citoplasmática é extremamente baixa, enquanto a concentração desses íons é alta no meio extracelular e nos compartimentos intracelulares que armazenam Ca^{2+}. Quando um sinal químico se liga a determinados receptores, forma-se trifosfato de inositol que promove a abertura dos canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso (Figura 6.7), aumentando a concentração desse íon na matriz citoplasmática e ativando os mecanismos intracelulares sensíveis ao cálcio. Todas as células contêm bombas em suas membranas que, consumindo energia de ATP, movimentam para fora da célula o excesso de Ca^{2+}. Além disso, as células contêm porções do retículo endoplasmático liso especializadas em armazenar íons cálcio (Figura 6.7). As membranas desse retículo também contêm bombas de cálcio, e, nas cisternas do retículo, há uma proteína especializada na captação

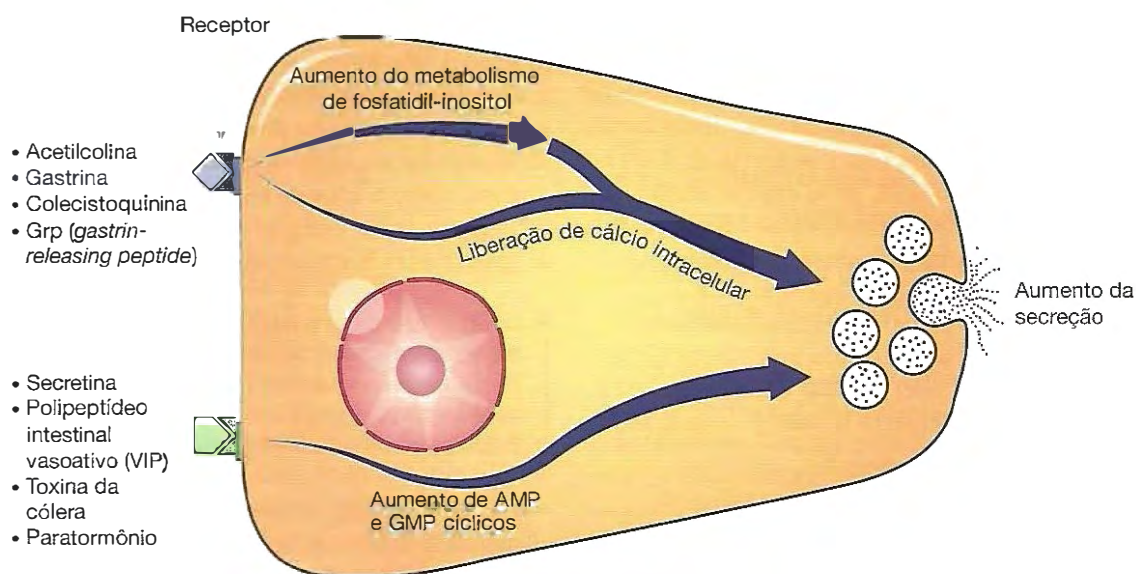



Figura 6.6 ▪ O desenho esquemático ilustra a formação de mensageiros intracelulares, usando como exemplo o estímulo secretório da célula exócrina (acinar) do pâncreas. A parte *superior* da figura mostra os sinais químicos que agem pela liberação de Ca^{2+}; já a parte *inferior* mostra o aumento da concentração dos nucleotídios cAMP e cGMP. Todos os sinais químicos indicados *à esquerda* (apenas alguns exemplos) aumentam a secreção pela célula acinar do pâncreas, embora ativem mecanismos intracelulares diferentes. (Com base em Gardner, J.D. and Jensen, R.T. Gastrintestinal peptides. The basis of action at cellular level. *Recent. Prog. Horm. Res*, **39**:211, 1983.)

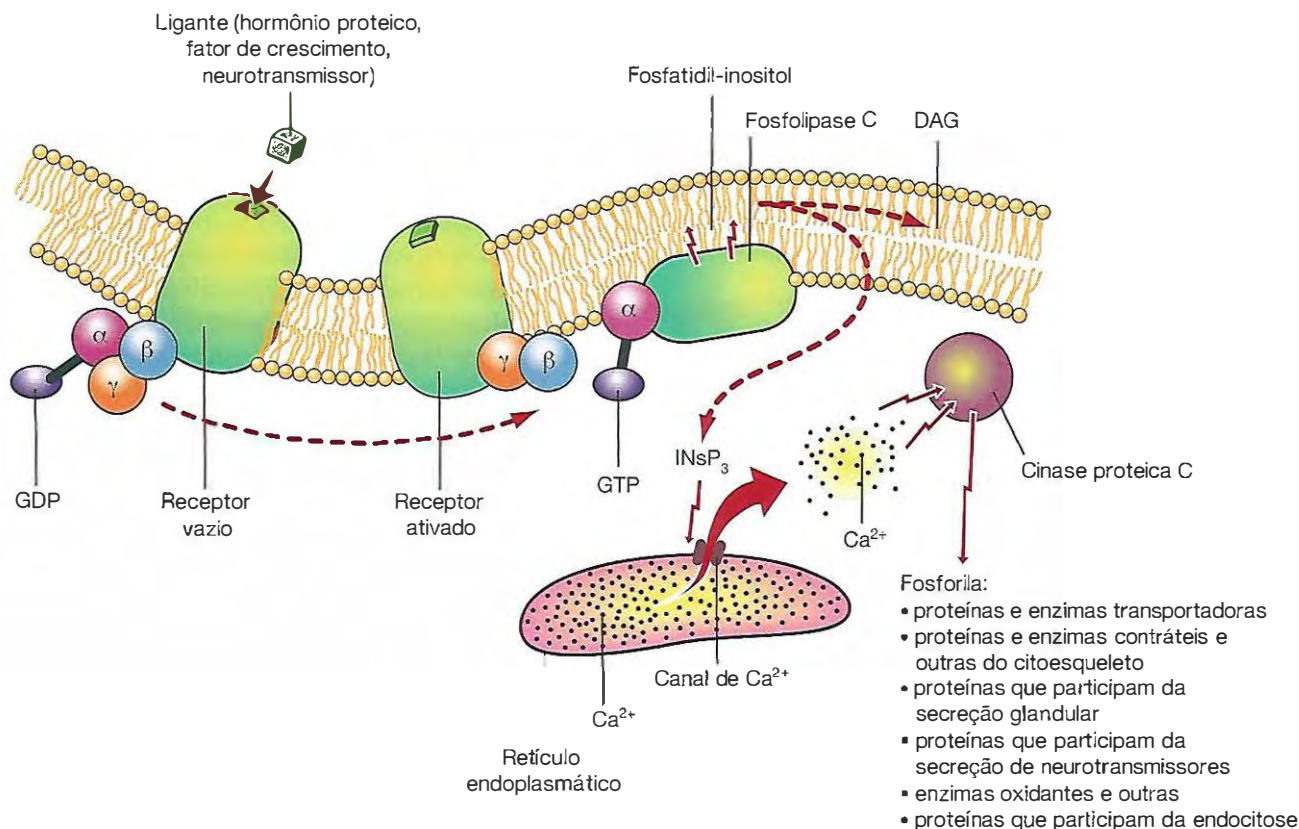



Figura 6.7 ▪ O desenho mostra a participação de uma proteína G na ativação intracelular por meio do cálcio e de DAG (diacilglicerol). Íons Ca^{2+} e DAG atuam sobre a quinase proteica C, ativando-a. A ativação dessa enzima influi em diversas atividades celulares.

e liberação de cálcio, denominada calsequestrina. As mitocôndrias também podem armazenar cálcio graças à atividade transportadora da membrana interna dessas organelas; mas, funcionalmente, o retículo liso é o compartimento sequestrador de cálcio mais importante.

Foi demonstrado que o Ca^{2+} funciona como um mensageiro intracelular em grande variedade de respostas, como a secreção celular e a proliferação mitótica. Foram descritas duas vias para aumentar os níveis de cálcio em resposta a um sinal químico. Principalmente nas células nervosas, o sinal químico abre um canal para o cálcio, situado na membrana plasmática, que normalmente está fechado. Como a concentração de Ca^{2+} é mais alta no meio extracelular, a abertura desses canais da membrana plasmática promove a penetração de Ca^{2+} no citosol. Nas demais células, o sinal, ao se ligar ao receptor da membrana, gera trifosfato de inositol, e este abre os canais para cálcio existentes na membrana do retículo endoplasmático liso, promovendo saída brusca do cálcio para o citosol. Tanto o AMP cíclico como o Ca^{2+}, que são os dois principais mensageiros intracelulares, atuam como pela adição de grupamentos fosfato do ATP a determinadas quinases proteicas, modificando a conformação espacial dessas enzimas e, assim, alterando a atividade delas.

Receptores catalíticos são glicoproteínas transmembrana com atividade enzimática

A maioria dos receptores da membrana plasmática age regulando a atividade de várias proteínas, até produzirem um mensageiro intracelular, geralmente cAMP ou Ca^{2+} (Figuras 6.6 e 6.7). Alguns receptores, porém, atuam mais diretamente e são chamados receptores catalíticos. Os receptores catalíticos são glicoproteínas transmembrana. Os mais bem estudados são quinases proteicas (atuam sobre proteínas) específicas para a tirosina. Esses receptores têm a parte que adere ao sinal químico (hormônio, fator de crescimento) exposta na superfície da membrana, e a parte que se localiza no citoplasma tem ação enzimática, ou está diretamente ligada a uma enzima. Quando a extremidade externa desses receptores recebe o sinal químico, a parte citoplasmática, que é uma quinase proteica, torna-se ativa, e transfere o grupamento fosfato terminal do ATP para o grupamento hidroxila da tirosina de determinadas proteínas. Essa família inclui os receptores para insulina e para diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) e o fator de crescimento da epiderme (EGF, *epidermal growth factor*).

Em virtude da importância médica da insulina, o receptor para esse hormônio tem sido muito estudado. Foi descoberto um receptor mutante para insulina no qual apenas um aminoácido é substituído, resultando em não reatividade a esse hormônio. As pessoas que apresentam esses receptores anormais são diabéticas, independentemente da produção pancreática de insulina.

Alguns receptores catalíticos (quinases da tirosina) atuam inicialmente sobre uma proteína ligada à superfície citoplasmática (superfície interna) da membrana celular, denominada proteína Ras (de *rat sarcoma*) porque foi descoberta em sarcomas (um tipo de câncer) de ratos. A proteína Ras participa da transmissão recebida por um receptor que é uma quinase da

tirosina (receptor catalítico) levando a informação, por meio de vários estágios, até o interior do núcleo celular para estimular a diferenciação e a multiplicação da célula. A proteína Ras, bem como outras que ligam receptores a efetores intracelulares, funciona como um interruptor que é ligado por GTP e desligado quando esse nucleotídio perde um radical fosfato e se transforma em GDP. Ras está ativada quando combinada com GTP, e inativa quando ligada a GDP.

A própria Ras hidrolisa GTP, que passa a GDP, desligando o sistema. Todavia, a atividade de Ras para retirar um grupo fosfato de GTP transformando-o em GDP é muito lenta e, como a concentração citosólica de GTP é maior do que a de GDP, Ras permaneceria ativa se a célula não tivesse mecanismos para desativá-la. As proteínas intracelulares que regulam a atividade da proteína Ras pertencem a dois grupos. As proteínas ativadoras das GTPases, denominadas GAP (acrônimo de GTP-*activating proteins*), aceleram a hidrólise do GTP ligado a Ras, transformando-o em GDP e inativando a proteína Ras. As GAP são, portanto, reguladores negativos, cuja atividade é contrabalançada pelos reguladores positivos, as GNRP (*guanine nucleotide releasing proteins*). As GNPR promovem a troca do nucleotídio ligado, estimulando a perda de GDP e a entrada de GTP oriundo do citosol, o que ativa a proteína Ras. Essa troca é facilitada porque o citosol contém maior concentração de GTP do que de GDP.

A proteína Ras permanece ativada por um tempo muito curto e, para exercer os efeitos iniciados pela ligação do sinal extracelular com o receptor, entra em ação uma sequência de modificações, em mais de um sistema, que leva o sinal para o núcleo da célula. Diversas quinases proteicas participam desses sistemas, porém o grupo mais importante é uma família de proteínas conhecida como quinases mitogênicas.

Além de Ras, existem outras proteínas, ligadas a receptores da membrana, que transmitem sinais para o núcleo, estimulando a diferenciação e a multiplicação das células. A proteína Ras foi escolhida como exemplo pelo fato de que, em 30% dos cânceres, foi encontrada uma proteína Ras anormal, que se mantém sempre ativa. Nos tecidos normais, as células se multiplicam somente em determinados momentos, mas no câncer a multiplicação é desordenada, pois os mecanismos que levam à proliferação celular estão ativados de modo permanente. Em diversos tipos de câncer (tumor maligno), foram encontradas outras proteínas anormais estimuladoras de mitose, além da proteína Ras anormal.

Receptores que atuam na proteína G aumentam a concentração de Ca^{2+} ou de cAMP

Os receptores com atividade de quinase proteica, ou receptores catalíticos, já estudados, são muito menos diversificados e menos numerosos. Os mais frequentes para a recepção de sinais hidrofílicos na superfície celular são os receptores ligados à proteína da membrana denominada proteína G, assim chamada porque pode conter GDP ou GTP. Essa proteína é um interruptor que é ligado por GTP e desligado quando esse nucleotídio é desfosforilado e se transforma em GDP.

Os receptores ligados às proteínas G são moléculas proteicas complexas, com sete passagens pela membrana. A captação de um sinal químico pelo segmento extracelular ativa o receptor que atua sobre a proteína G, e esta, por meio de uma cadeia de reações, gera cAMP ou Ca^{2+}, que irão ativar quinases proteicas. As quinases, ativadas por essa via, irão adicionar grupamentos fosfato à serina ou à treonina de determinadas proteínas, que são os alvos do sinal captado pelo receptor. Trata-se de uma via muito importante para o funcionamento das células eucariontes, e já foram identificadas numerosas quinases proteicas, influenciadas pelos receptores ligados às proteínas G.

As moléculas das proteínas G são formadas por três polipeptídios chamados cadeias α, β e γ. As três cadeias estão localizadas na face citoplasmática da membrana celular. A cadeia α tem a capacidade de se ligar a GDP ou GTP e é a parte da molécula da proteína G que ativa a próxima molécula na cadeia efetora. Quando está ligada a GDP e, portanto, o interruptor está desligado, a cadeia α tem grande afinidade pelas cadeias β e γ. Assim, a molécula da proteína G permanece inativa e com suas três cadeias fortemente presas. A ligação de um sinal químico ativa a parte citoplasmática do receptor, que, então, adiciona um grupo fosfato ao GDP da cadeia α, tornando-a ativa e liberando-a das outras duas cadeias da molécula da proteína G. Enquanto o receptor estiver ocupado por um sinal, a cadeia α permanece ativa e separada das outras duas cadeias (Figura 6.7). Quando o receptor e o sinal químico se separam, a própria cadeia α hidrolisa o GTP, transformando-o em GDT. Em consequência, as três cadeias da proteína G se prendem novamente, e o interruptor é desligado.

As proteínas G são de ocorrência muito geral e já foram detectadas em muitos vertebrados, invertebrados e em células de vegetais. Essa distribuição tão ampla indica que essas proteínas surgiram muito cedo durante a evolução dos seres multicelulares. O surgimento dos seres multicelulares foi um passo muito demorado na evolução, provavelmente pela dificuldade no estabelecimento de mecanismos de comunicação entre as células, essenciais para coordenar o funcionamento de cada célula em benefício do conjunto. Nesses conjuntos, cada célula só pode realizar uma pequena parte do programa contido no seu genoma, daí a importância dos mecanismos que restringem o que cada célula pode fazer, sem prejudicar o conjunto.

As proteínas G atuam por meio de duas vias: uma dependente de cAMP e a outra dependente de íons Ca^{2+} liberados do REL pela ação de trifosfato de inositol

Embora os mensageiros intracelulares produzidos pelas proteínas G formem sempre quinases proteicas que irão fosforilar aminoácidos, isso é obtido por meio de duas vias. Uma via gera AMP cíclico, cAMP, produzido de ATP pela enzima adenilato ciclase. Como o cAMP é uma molécula pequena, difunde-se rapidamente pelo citosol, indo ativar diversas quinases proteicas. A outra via consiste na ruptura da molécula de um fosfolipídio da membrana, o fosfatidil-inositol, reação que é catalisada pela fosfolipase C, produzindo trifosfato de inositol, que também é uma molécula pequena e solúvel, formada pelo

inositol mais três grupamentos fosfato. Na reação, também se forma diacilglicerol que fica preso à bicamada lipídica da membrana, podendo ser reaproveitado para formar lipídios da membrana. O trifosfato de inositol se difunde pelo citosol e abre os canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso, principal depósito citoplasmático de Ca^{2+}, liberando esse íon para o citosol.

Para o bom funcionamento do sistema, é importante que os mensageiros sejam degradados após realizarem suas funções. O cAMP é rapidamente destruído pelas cAMP fosfodiesterases. O trifosfato de inositol, por meio de algumas reações, é transformado de volta ao estado de fosfatidil-inositol. Os íons Ca^{2+} são retirados do citosol por meio de canais seletivos (bombas de cálcio) localizados nas membranas do retículo endoplasmático liso e na membrana celular, que transferem Ca^{2+} para as cisternas do retículo ou para o meio extracelular, respectivamente.

Modificações adaptativas nas células-alvo

Uma célula exposta ao mesmo estímulo (sinal químico), por um longo período de tempo, passa a responder ao estímulo com intensidade menor. Por meio desse processo, chamado de adaptação ou dessensibilização, a célula ajusta de modo reversível sua sensibilidade ao nível do estímulo. No caso dos sinais químicos, a dessensibilização possibilita que as células, dentro de determinados limites, ajustem-se a modificações na concentração das moléculas sinalizadoras.

Essa adaptação se deve a vários mecanismos. Pode haver diminuição da quantidade de receptores; ou esses receptores podem modificar-se, diminuindo sua afinidade para o ligante. Outras vezes, ocorrem modificações nas proteínas intermediárias entre os receptores e os mensageiros intracelulares cAMP ou Ca^{2+}.

A dessensibilização é, muitas vezes, consequência da endocitose

Quando os hormônios proteicos e os fatores de crescimento se ligam a receptores da membrana da célula-alvo, frequentemente provocam a endocitose. Muitas vesículas de endocitose, mas não todas, fundem-se com os endossomos, onde o pH ácido separa os ligantes dos receptores, e, algumas vezes, os receptores são digeridos pelas enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Esse processo limita a ação do hormônio e regula a concentração de receptores na superfície celular. Embora a formação de vesículas endocíticas ocorra continuamente, mesmo na ausência de ligante, existe uma aceleração no processo quando o ligante se une ao receptor. Experimentos realizados com fibroblastos mostraram que a presença do fator de crescimento da epiderme, que se fixa a receptores fibroblásticos, acelera de modo muito acentuado a degradação desses receptores. Portanto, concentrações altas do ligante diminuem o número de receptores e, consequentemente, reduzem também a sensibilidade da célula ao sinal químico. Por meio desse tipo de regulação dos receptores para menos *(receptors-down regulation)*, a célula ajusta sua sensibilidade à concentração da molécula sinalizadora.

A maioria dos receptores endocitados, porém, não é digerida pelos lisossomos, mas sim reciclada de volta para a membrana plasmática. Nesses casos, quando há aumento da concentração do ligante, há também elevação da quantidade de receptores localizados em vesículas endocitóticas situadas no citoplasma e, portanto, inacessíveis ao sinal que chega à superfície celular. Há uma queda na sensibilidade da célula em razão do sequestro dos receptores.

Hormônios lipossolúveis atuam sobre receptores intracelulares

Muitos aspectos do desenvolvimento intrauterino e pós-natal, e das funções de muitos órgãos, são regulados por diversos hormônios esteroides. Todos esses hormônios são sintetizados a partir do colesterol, e são moléculas pequenas, com cerca de 300 Da (dáltons), lipossolúveis, capazes de atravessar facilmente as membranas celulares por difusão passiva. Esses hormônios (p. ex., estrógenos, testosterona) são transportados pelo plasma sanguíneo, sob a forma de complexos com proteínas anfipáticas, isto é, que apresentam moléculas com regiões hidrofóbicas, em que se ligam os hormônios esteroides, e regiões hidrofílicas, responsáveis pela solubilidade do complexo no plasma sanguíneo e no líquido que banha as células. Antes de sua penetração nas células, esses hormônios se separam da proteína transportadora, que permanece no líquido extracelular.

Uma vez penetrando nas células-alvo, os hormônios esteroides se ligam a receptores específicos e causam modificações na conformação espacial desses receptores (Figura 6.8). Essa modificação, que se chama ativação do receptor, aumenta a afinidade do receptor para o DNA, e a possibilidade de união do receptor proteico ativado a determinados segmentos de genes nucleares específicos, regulando a transcrição desses genes. Os hormônios da tireoide (tiroxina ou T4, e tri-iodotironina ou T3) são aminoácidos hidrofóbicos modificados, mas atuam de modo semelhante aos hormônios esteroides.

O receptor ativado por hormônios esteroides prende-se a sequências específicas de DNA e influencia a transcrição gênica

Alguns tipos de receptores para hormônios esteroides localizam-se principalmente no citoplasma, e outros são mais abundantes no núcleo. Nos dois casos, os receptores (proteínas) são inativos, e só adquirem atividade quando se ligam de modo seletivo ao respectivo hormônio (Figura 6.8). A união dos complexos receptor + hormônio a locais específicos do DNA geralmente ativa os genes próximos, porém algumas vezes o efeito é inibidor, quer dizer, a formação de mRNA por esses genes em geral é estimulada, porém algumas vezes é inibida. O segmento de DNA que reconhece o complexo receptor + hormônio é constituído por um número pequeno de nucleotídios.

Considerando-se uma célula-alvo, verifica-se que somente alguns genes são afetados por determinado hormônio esteroide; por exemplo, na célula hepática foram estudadas cerca de 1.000 proteínas diferentes. Quando a célula hepática é submetida ao hormônio esteroide cortisol (produzido pela camada cortical da glândula adrenal), apenas seis dessas proteínas

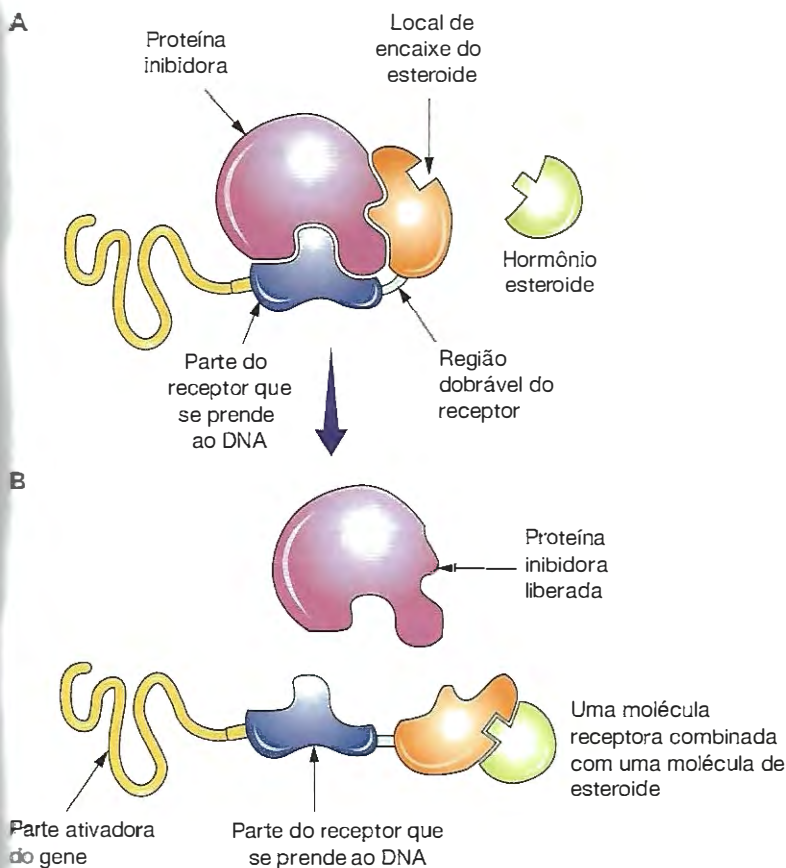



Figura 6.8 ▪ O desenho esquemático mostra o modelo proposto para a configuração espacial do receptor para hormônio esteroide e as modificações sofridas pelo receptor ao se combinar com o respectivo hormônio. **A.** Receptor não combinado com o esteroide; esse receptor é inativo porque o segmento de sua molécula que tem afinidade pelo DNA está coberto por uma proteína inibidora. **B.** O hormônio esteroide modifica a forma do complexo receptor, libera a molécula da proteína inibidora e expõe a região do receptor que tem afinidade para o DNA; assim, o complexo do esteroide com seu receptor combina-se com determinadas sequências nucleotídicas do DNA nuclear e influi na atividade gênica. Geralmente há um aumento na síntese de RNA mensageiro.

aumentam de quantidade, enquanto uma diminui. O efeito do cortisol é reversível, e a velocidade de síntese das proteínas afetadas volta ao normal quando o hormônio é removido. Foi observado, também, que cada célula hepática contém cerca de 10.000 receptores e que a ativação de todos esses receptores pelo cortisol influencia apenas uns 50 genes, número muito menor do que o de segmentos de DNA que fixam o receptor ativado. Parece que muitos complexos de cortisol com o receptor se prendem a segmentos de DNA que não têm qualquer efeito sobre a síntese proteica.

Os genes regulados pelos hormônios esteroides são diferentes conforme o tipo de célula-alvo

Como acontece com os hormônios em geral, a resposta aos hormônios esteroides depende do próprio hormônio e das características da célula-alvo. Os receptores podem ser semelhantes, mas os genes ativados são diferentes, conforme o tipo celular. Diversos estudos mostraram que os receptores para estradiol e progesterona (hormônios femininos) e cortisol são iguais e são codificados por um único gene. Os receptores para o hormônio esteroide masculino testosterona é diferente e codificado por outro gene.

Na doença denominada feminização testicular, o paciente apresenta fenótipo feminino, embora seu genótipo seja masculino (XY). Essa doença é consequência de uma mutação no gene do receptor para a testosterona. O receptor ainda é capaz de se ligar à testosterona, mas a modificação conformacional que possibilita a ligação do receptor com o DNA é defeituosa. Dessa maneira, deixam de ser sintetizadas as proteínas que normalmente são produzidas em resposta à testosterona. Por outro lado, o mecanismo de retroalimentação que inibe a produção excessiva de testosterona não funciona, porque o hipotálamo também não tem receptores normais para testosterona, e a concentração de testosterona nos líquidos extracelulares se torna anormalmente alta. Como a testosterona é um precursor de estradiol (hormônio feminino), aumenta a concentração de estradiol e, sendo normais os receptores celulares para estradiol, desenvolve-se o fenótipo feminino.

Comunicação parácrina

No corpo dos animais, existem células especializadas na secreção parácrina, ou seja, na produção de mediadores químicos de ação local; por exemplo, histamina e heparina são sintetizadas por células do tecido conjuntivo denominadas mastócitos. Esse tipo celular apresenta o citoplasma repleto de grânulos, que contêm os mencionados mediadores parácrinos. Os grânulos são expulsos dos mastócitos mediante estimulo imunitário, ação de agentes químicos, lesão tecidual e outros estímulos.

Muitas outras células, embora não especializadas nesse sentido, podem produzir diversos mediadores com ação local, na inflamação, na proliferação celular, na contração da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, tubo digestivo e brônquios, e na secreção celular. Como exemplo, serão mencionadas as prostaglandinas, produzidas praticamente por todas as células do organismo humano. Existem pelo menos 10 famílias de prostaglandinas, denominadas PGA, PGB, PGC, PGD, PGE, PGF, PGG, PGH, PGI e PGJ. Cada uma dessas famílias apresenta vários subtipos. As prostaglandinas têm efeitos extremamente variados, e apresentam grande interesse biológico e médico. Todas as prostaglandinas são derivadas de um ácido graxo com 20 átomos de carbono, o ácido araquidônico. Esse ácido graxo se forma a partir dos fosfolipídios da membrana plasmática, pela ação de fosfolipases que são ativadas por estímulos específicos e inespecíficos, variáveis de uma célula para outra.

Seria impossível mencionar todos os efeitos das prostaglandinas. Elas parecem regular a flexibilidade dos eritrócitos, que se deformam para atravessar os capilares sanguíneos mais finos. Algumas prostaglandinas diminuem a secreção de ácido clorídrico pelas glândulas da mucosa do estômago, e inibem a formação de úlceras pépticas (úlceras do estômago). Outras participam da regulação do aparelho reprodutor feminino, influindo no ciclo menstrual. Prostaglandinas estimulam a contração do músculo liso do útero, podendo induzir o aborto quando injetadas no saco amniótico do embrião durante o primeiro trimestre da gestação. Injeções intravenosas no nono mês de gestação induzem o parto.

Além das prostaglandinas, o ácido araquidônico da membrana plasmática dá origem a outros mediadores de ação local. Todos os mediadores derivados do ácido araquidônico são conhecidos pelo nome genérico de eicosanoides, e incluem as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos. Todos esses compostos participam do processo inflamatório. Os anti-inflamatórios de natureza esteroide, como a cortisona, inibem a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios da membrana, bloqueando assim a produção de todos os mediadores locais mencionados: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Anti-inflamatórios não esteroides, como o ácido acetilsalicílico e a indometacina, bloqueiam a formação de prostaglandinas e tromboxanos, mas não impedem a formação de leucotrienos.

Algumas células produzem o gás óxido nítrico, NO, que se dissolve e age como secreção parácrina (o óxido nítrico também é um neurotransmissor); por exemplo, os macrófagos e os neutrófilos secretam óxido nítrico nos locais de inflamação, como parte do mecanismo para livrar os tecidos de microrganismos invasores. O papel do óxido nítrico como sinal parácrino foi bem estudado nas células que revestem internamente os vasos sanguíneos, chamadas células endoteliais. As células endoteliais têm receptores específicos que captam o neurotransmissor acetilcolina (receptores colinérgicos) liberado pelas terminações dos nervos do sistema autônomo parassimpático. Os receptores colinérgicos fazem conexão com uma proteína G, que estimula a formação de trifosfato de inositol, em uma cadeia que leva à liberação de íons Ca^{2+} do seu reservatório no REL para o citosol da célula endotelial. O íon Ca^{2+} ativa a sintetase do óxido nítrico presente no citoplasma da célula endotelial, que, então, sintetiza esse gás. O óxido nítrico se difunde rapidamente, atravessa a membrana da célula endotelial e penetra, também por difusão passiva, no citoplasma da célula muscular lisa, que está muito próxima. No interior da célula muscular lisa, o NO se liga ao grupo prostético hemo da enzima solúvel guanilato ciclase, ativando essa enzima. Em consequência, há aumento na concentração do mensageiro intracelular GMP cíclico (cGMP) no citosol da célula muscular lisa. O cGMP estimula uma quinase proteica específica, que fosforila determinadas proteínas responsáveis pelo relaxamento das células musculares lisas, o que leva à dilatação do vaso sanguíneo e ao aumento do fluxo de sangue no local.

O efeito vasodilatador do óxido nítrico explica o mecanismo de ação da nitroglicerina, usada há muitos anos para o tratamento da dor da angina do peito, que é devida a uma diminuição do fluxo de sangue no músculo cardíaco. A nitroglicerina é transformada pelo organismo em óxido nítrico; esse gás relaxa a musculatura lisa dos vasos sanguíneos, aumentando o diâmetro dos vasos e o volume de sangue que é oferecido às células musculares estriadas do músculo cardíaco.

Moléculas neurotransmissoras são responsáveis pela transmissão de informações por meio das sinapses

As células nervosas ou neurônios são de forma e tamanho muito variados, porém, salvo raras exceções, apresentam um corpo celular ou pericário, do qual partem prolongamentos de dois tipos: os dendritos e o axônio. Este último termina por uma arborização, o terminal axônico (Figura 6.2). Funcionalmente, os neurônios apresentam partes receptoras, condutoras e transmissoras de informações.

O centro trófico do neurônio é o seu pericário, que contém o núcleo, abundante retículo endoplasmático rugoso, muitos polirribossomos livres e aparelho de Golgi bem desenvolvido. É no pericário que tem lugar a síntese das macromoléculas, não só para o corpo celular, mas também para os dendritos e o axônio. O pericário é também receptor de mensagens trazidas pelas moléculas neurotransmissoras, liberadas pelos terminais axônicos de outros neurônios.

Os dendritos, em geral numerosos, porém curtos, são prolongamentos que se ramificam tal como os galhos de uma árvore (*dendro*, galho), tornando-se cada vez mais finos. Têm principalmente função receptora, aumentando muito a área para recepção de neurotransmissores.

Cada neurônio contém apenas um axônio, cujo diâmetro é constante em toda a sua extensão, apesar de alguns axônios serem muito longos, podendo atingir 1 metro de comprimento. O axônio apresenta muitos microtúbulos e filamentos intermediários, ambos em continuação com estruturas semelhantes existentes no pericário.

No fim de seu trajeto, o axônio se divide em numerosos ramos, formando o terminal axônico, no qual são liberados os neurotransmissores que irão atuar sobre receptores situados na membrana da célula seguinte, que pode ser outra célula nervosa, uma célula muscular ou uma célula glandular.

O terminal axônico forma com a célula seguinte da cadeia uma estrutura de complexidade variável, a sinapse. As sinapses que se formam entre os axônios e as células (fibras) musculares esqueléticas são bem conhecidas pela facilidade de seu estudo, tanto por meio de técnicas fisiológicas como por meio de técnicas morfológicas. Essas sinapses são denominadas placas motoras.

O microscópio eletrônico mostra que, nas sinapses, as membranas das duas células são separadas por uma fenda de 20 nm, o intervalo sináptico. A membrana plasmática do terminal axônico é denominada membrana pré-sináptica, e a da célula seguinte, membrana pós-sináptica (Figuras 6.2 e 6.3). A membrana pós-sináptica contém receptores para o neurotransmissor liberado na membrana pré-sináptica. A resposta da transmissão sináptica é extremamente rápida, em razão, principalmente, da pequena distância que o neurotransmissor atravessa, da riqueza de receptores e da grande afinidade entre os neurotransmissores e seus receptores.

É necessário que o neurotransmissor seja inativado imediatamente, para que sua ação não permaneça muito tempo, o que diminuiria a capacidade da transmissão sináptica de graduar com precisão sua atividade. No caso da sinapse neuromuscular (placa motora), o transmissor é a acetilcolina, contida nas numerosas vesículas sinápticas do terminal axônico (Figura 6.3). A acetilcolina é liberada por exocitose, atua sobre os receptores da membrana pós-sináptica, promovendo a contração da fibra muscular, e é imediatamente inativada por difusão e, principalmente, pela ação da enzima acetilcolinesterase. Essa enzima é produzida pela fibra muscular estriada e permanece ligada ao glicocálice dessas fibras na altura da sinapse.

A transmissão sináptica apresenta numerosas variações do modelo anteriormente descrito como exemplo, mas o estudo

dessas variedades situa-se além dos limites impostos a este livro. A variedade de moléculas neurotransmissoras é muito grande. Além da acetilcolina, podem-se mencionar, como exemplos: epinefrina, norepinefrina, ácido gama-aminobutírico ou GABA (*gama-amino-butiric acid*), dopamina, serotonina e glicina.

Muitas vezes, a mesma molécula pode agir como neurotransmissora e também por outro modo de comunicação. Por exemplo, a epinefrina e a norepinefrina, além de neurotransmissoras (sintetizadas nos neurônios e liberadas pelos axônios), são produzidas pela camada medular da glândula adrenal (endócrina) e distribuídas pelo corpo, atuando assim como hormônios.

A membrana interna da maioria das mitocôndrias contém receptores para os hormônios da tireoide (T3 e T4)

Já foi mencionado, neste capítulo, que os hormônios da tireoide agem sobre o DNA, por meio de receptores situados no citoplasma e no núcleo das células-alvo.

Apenas como exemplo da complexidade do assunto, será explicada, a seguir, a atuação dos hormônios da tireoide (T3 e T4) diretamente sobre as mitocôndrias.

Em animais com hipotireoidismo (deficiência em hormônios da tireoide), ocorrem alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias. Nesses animais, a administração de T3 ou T4 aumenta a captação de ADP e a formação de ATP. Foi demonstrada a existência de um receptor específico para T3 e T4 na membrana mitocondrial interna, que é o local onde ocorre a fosforilação oxidativa. Esses receptores só existem nos tecidos que respondem aos hormônios da tireoide, estando ausentes dos tecidos reconhecidamente insensíveis a esses hormônios, como o encéfalo e o testículo. Foi observado, também, que as mitocôndrias das células do cérebro de ratos recém-nascidos contêm receptores para T3 e T4, mas esses receptores desaparecem com o crescimento do animal. Essas observações explicam por que o hipotireoidismo que se inicia em crianças recém-nascidas leva ao cretinismo, doença cujos sintomas decorrem, em grande parte, da deficiência no funcionamento do cérebro. Já o hipotireoidismo no adulto não causa cretinismo, mas pode acarretar, se não tratado outra doença denominada mixedema, que não envolve defeitos cerebrais, mas um espeçamento ou "edema duro" do tecido conjuntivo.

Outra comprovação de que os hormônios da tireoide atuam diretamente sobre as mitocôndrias foi fornecida pela observação, *in vitro*, de que T3 e T4 aumentam o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas.

Resumo

A troca de informações entre as células que constituem o corpo de um ser pluricelular se estabelece já na fase embrionária e mantém sua importância durante toda a vida do animal. Essas informações são transmitidas por meio de moléculas (sinais químicos) que percorrem distâncias diversas entre a célula emissora e a receptora do sinal.

Os sinais químicos possibilitam que as células se organizem em tecidos e que se constituam os órgãos, pela agregação coerente de tecidos diferentes. Esses sinais coordenam o crescimento e as funções dos diversos órgãos do corpo, controlam o metabolismo de células situadas em órgãos diferentes, coordenam a secreção das glândulas endócrinas e exócrinas, influenciam mecanismos de defesa como a fagocitose, o processamento de antígenos (moléculas estranhas) e a síntese de anticorpos (moléculas de defesa). Influenciam, também, a contração do coração, do músculo esquelético e do músculo liso localizado na parede de órgãos como o estômago, intestinos, útero e vasos sanguíneos. Quase todas as funções celulares são reguladas pela troca de sinais químicos entre elas.

A molécula sinalizadora é chamada ligante, e a molécula celular que se prende ao ligante e possibilita a resposta chama-se receptor.

Considerando-se principalmente a distância percorrida pela molécula sinalizadora e as características de seu trajeto, distinguem-se três tipos de comunicação:

- **1º tipo:** a comunicação por meio de hormônios que, transportados pelo sangue, vão agir à distância sobre as células que contêm os receptores respectivos, ditas células-alvo
- **2º tipo:** a comunicação parácrina, na qual a molécula sinal difunde-se alguns milímetros ou centímetros no meio extracelular e atuar sobre células próximas
- **3º tipo:** a comunicação por meio de moléculas neurotransmissoras, que ocorre nas sinapses, estruturas muito especializadas que conectam, funcionalmente, uma célula nervosa (neurônio) com outra, ou com células musculares ou glandulares. Um prolongamento do neurônio, denominado axônio, conduz as moléculas neurotransmissoras e as libera no terminal axônico, que é um dos componentes da sinapse. Na sinapse, a membrana do terminal axônico e a da célula receptora do sinal (outro neurônio, uma célula muscular ou glandular) estão separadas por um espaço de apenas 20 nm.

Muitas moléculas sinalizadoras podem agir por mais de um dos tipos de transmissão mencionados. Como exemplo, podem ser citados os hormônios epinefrina e norepinefrina, produzidos pela camada medular das glândulas adrenais. Essas moléculas são sintetizadas, também, pelas células nervosas e liberadas em determinados terminais axônicos. Portanto, a norepinefrina e a epinefrina agem como hormônios e como neurotransmissores.

Cerca de 80% dos hormônios são moléculas hidrossolúveis (polipeptídios, proteínas) e se ligam a receptores que são proteínas integrais da membrana das células-alvo. Ao se combinarem aos respectivos hormônios, os receptores acionam os mecanismos intracelulares que aumentam a concentração de Ca^{2+} ou de cAMP (adenosina-monofosfato cíclico).

Os hormônios lipossolúveis, como os hormônios esteroides da camada cortical da glândula adrenal, os dos ovários (estrógenos, progesterona) e dos testículos (testosterona), bem como os hormônios da glândula tireoide (T3 e T4) que são aminoácidos modificados, atravessam facilmente a membrana celular e penetram na célula, indo agir em receptores especí-

ficos localizados no citoplasma e no núcleo. Ao se combinarem com os respectivos hormônios, esses receptores adquirem afinidade para determinadas sequências nucleotídicas do DNA, com as quais se combinam de modo reversível. Essa combinação altera a atividade dos genes próximos, que passam, geralmente, a produzir maior quantidade dos respectivos RNA mensageiros, mas algumas vezes há diminuição e não aumento da transcrição gênica.

Como exemplo da comunicação com células próximas (secreção parácrina), pode ser citada a histamina produzida pelos mastócitos (células do tecido conjuntivo). A histamina tem ação sobre as células musculares lisas, células do endotélio dos capilares sanguíneos e outras. Outros mediadores parácrinos são derivados do ácido graxo araquidônico (20 átomos de carbono), como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Os derivados do ácido araquidônico desempenham papel relevante na defesa, através do mecanismo genericamente chamado inflamação.

Os neurotransmissores são de ação rápida, de breve duração e participam das funções cerebrais superiores e do controle da contração muscular e da secreção das glândulas endócrinas e exócrinas. A neurotransmissão depende de estruturas altamente especializadas, as sinapses. Nessas estruturas, o espaço entre a membrana da célula transmissora e da célula receptora é de apenas 20 nm. Os receptores dos neurotransmissores estão sempre localizados na membrana da célula receptora, nos locais das sinapses.

Bibliografia

Baldwin, J.M.: Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**:180, 1994.

Barrit, G.J.: *Communication within Animal Cells*. Oxford Univ. Press, 1992.

Berridge, M.: The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Amer.*, **253**(4):142, 1985.

Bootman, M.D. and Berridge, M.J.: The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, **83**:675, 1995.

Evans, R.M.: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**:889, 1988.

Gerday, C., Gilles, R. and Bolis, L. (eds.): *Calcium and Calcium Binding Proteins*. Springer Verlag, 1988.

Hecker, M., Foegh, M.L. and Ramwell, P.W.: The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, related components. *In*: Katzung, B.G. (ed.): *Basic and Clinical Pharmacology*, 7th ed. Appleton and Lange, p. 304-318, 1998.

Kliewer, S.A., Lehmann, J.M. and Willson, T.M.: Orphan nuclear receptors: Shifting endocrinology into reverse. *Science*, **284**:757, 1999.

Levitzki, A.: From epinephrine to cyclic AMP. *Science*, **241**:800, 1988.

Mangelsdorf, D.J. *et al.*: The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, **83**:835, 1995.

Plaut, M.: Lymphocyte hormone receptors. *Ann. Rev. Immunol.*, **5**:621, 1987.

Roth, J. and Taylor, S.J.: Receptors for peptide hormones: alterations in disease of humans. *Ann. Rev. Physiol.*, **44**:639, 1982.

Snyder, S.H.: The molecular basis of communication between cells. *Sci. Amer.*, **253**(4):132, 1985.

Wilson, J.D. and Foster, D.W.: *William's Textbook of Endocrinology*, 7th ed. Saunders, 1985.

7 Bases Moleculares do Citoesqueleto e dos Movimentos Celulares

Roteiro

- O citoesqueleto mantém a forma das células e é responsável pela contração celular, pelos movimentos da célula e pelo deslocamento de organelas, vesículas e partículas no citoplasma
- Filamentos de actina, microtúbulos e as proteínas motoras miosina, dineína e cinesina são os principais constituintes do citoesqueleto e responsáveis pelos movimentos celulares
- Os filamentos de actina se associam a diversas proteínas e, por meio delas, fixam-se na membrana plasmática, no envoltório nuclear e em outros componentes das células
- Nas células eucariontes, grande parte dos movimentos se deve ao deslizamento de filamentos de miosina sobre os de actina
- As células musculares são especializadas para a contração
- A unidade contrátil das células musculares estriadas é o sarcômero
- Cada sarcômero é separado do outro por uma estrutura contendo desmina, a estria Z
- No sarcômero, além dos filamentos de actina e de miosina, encontram-se outras proteínas que participam da disposição ordenada desses filamentos no músculo estriado e do controle da contração
- Ao chegar à fibra muscular estriada, o impulso nervoso causa um fluxo de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso para o citosol, desencadeando a contração muscular
- As células mioepiteliais são contráteis e ajudam a expulsar a secreção das glândulas exócrinas
- Os movimentos dos cílios e flagelos das células eucariontes se devem à atividade de microtúbulos, sem a participação do sistema actina-miosina.

Muitas células têm forma irregular, existindo algumas, como os neurônios ou células nervosas, com prolongamentos muito longos. Por outro lado, núcleo, organelas, vesículas de secreção e outros componentes celulares têm localização definida, quase sempre constante, conforme o tipo celular. Essas observações levaram os citologistas a admitirem a existência de um citoesqueleto que desempenharia apenas um papel mecânico, de suporte, mantendo a forma celular e a posição de seus componentes. Estudos posteriores, além de confirmarem a existência do citoesqueleto, mostraram que seu papel funcional é muito mais amplo; ele estabelece, modifica e mantém a forma das células. Além disso, é, também, responsável pelos movimentos celulares como contração, formação de pseudópodos e deslocamentos intracelulares de organelas, cromossomos, vesículas e grânulos diversos.

Os principais elementos do citoesqueleto são os microtúbulos, filamentos de actina, filamentos de miosina, filamentos intermediários e macromoléculas proteicas diversas. Esses elementos estruturais constituem um conjunto dinâmico que assume aspectos diferentes, de acordo com o tipo celular e com as necessidades da célula. De todos os componentes do citoesqueleto, apenas os filamentos intermediários são estáveis, exercendo somente funções de sustentação, sem participar dos movimentos celulares.

Os deslocamentos intracelulares de organelas e outras partículas se devem às proteínas motoras, que podem ser divididas em dois grandes grupos: as dineínas e cinesinas, que causam deslocamentos em associação com os microtúbulos e as miosinas, que podem formar filamentos e atuam em associação com os filamentos de actina. Não se conhece proteína motora que se apoie nos filamentos intermediários para produzir deslocamentos intracelulares.

Figura 7.1 ▪ Desenho de microtúbulo, que mostra as duas subunidades (α e β) que constituem a molécula de tubulina. O arranjo das moléculas de tubulina cria 13 protofilamentos, que constituem a parede do microtúbulo. O número de protofilamentos fica bem visível no corte transversal de microtúbulo que aparece na parte superior da ilustração.

Microtúbulos

A microscopia eletrônica mostrou que o citoplasma contém cilindros muito delgados e longos, denominados microtúbulos, com 24 nm de diâmetro. Cada microtúbulo é formado pela associação de dímeros proteicos (Figuras 7.1 e 7.2) dispostos em hélice. Os dímeros têm um peso aproximado de 110 kDa (quilodáltons) e são constituídos por duas cadeias polipeptídicas de estruturas semelhantes, mas não iguais, chamadas tubulinas alfa e beta, que se juntam para formar os dímeros. Em corte transversal ao microtúbulo, sua parede mostra-se constituída por um anel com 13 dímeros (Figuras 7.1, 7.2 e 7.3). Os microtúbulos estão em constante reorganização, crescendo por uma de suas extremidades graças à polimerização local dos dímeros de tubulina, e diminuindo na outra extremidade, onde predomina a despolimerização. A extremidade que cresce é denominada extremidade mais (+) e a outra é a extremidade menos (–). Os processos de alongamento e encurtamento dos microtúbulos são devidos ao desequilíbrio entre polimerização e despolimerização.

O citosol contém um *pool* de dímeros de tubulina não polimerizada, de modo que a formação de microtúbulos não depende da síntese proteica concomitante. A polimerização desses dímeros de tubulina para formar microtúbulos é regulada pela concentração de íons Ca^{2+} e pelas proteínas associadas aos microtúbulos (MAPS, *microtubule associated proteins*). A concentração de íons Ca^{2+} atua de modo mais rápido, nas polimerizações de curta duração, e as MAPS participam principalmente das polimerizações mais duráveis. Nas células, a estabilidade dos microtúbulos é muito variável. Os dos cílios, por exemplo, são muito estáveis, os do fuso mitótico se formam na mitose e desfazem com o término desse processo, enquanto os microtúbulos dispersos no citoplasma têm vida ainda mais curta. Existe na célula um intercâmbio constante entre os dímeros de tubulina livres no citoplasma e os dímeros polimerizados encontrados nos microtúbulos.

Os microtúbulos participam da movimentação de cílios e flagelos, transporte intracelular de partículas, deslocamento dos cromossomos na mitose, estabelecimento e manutenção da forma das células. O papel dos microtúbulos na manutenção da forma celular foi bem estudado nos heliozoários. Esses protozoários são envoltos por expansões muito finas do citoplasma, os axonemas, que se dispõem radialmente em relação à célula (Figura 7.4A). Nas micrografias eletrônicas, obser-

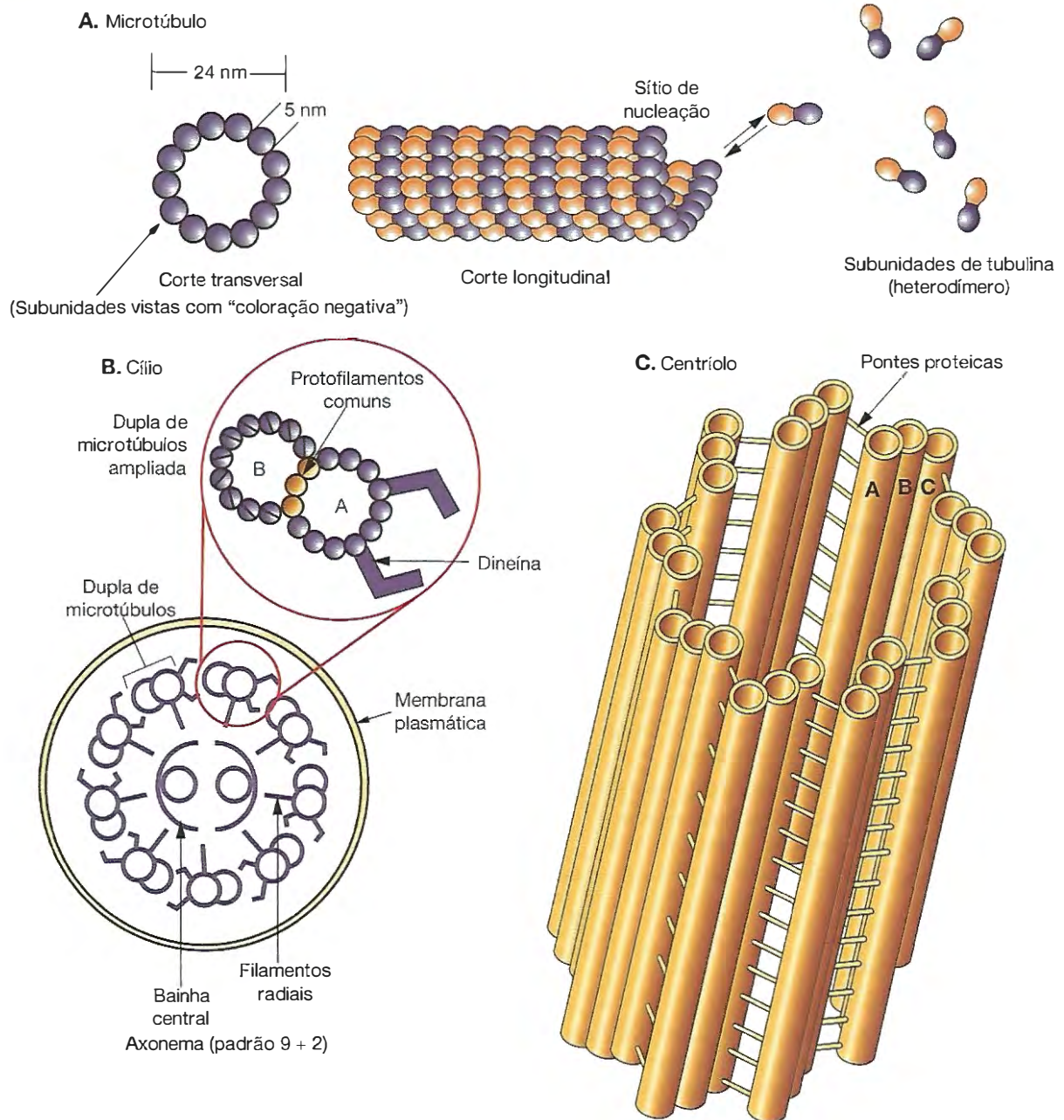



Figura 7.2 ▪ Representação esquemática de microtúbulos, cílio e centríolo. **A.** Microtúbulos vistos ao microscópio eletrônico após fixação com glutaraldeído e ácido tânico. As subunidades de tubulina, não coradas, são delineadas pelo ácido tânico, que é elétron-denso. O corte transversal dos microtúbulos revela um anel de 13 subunidades. Os microtúbulos podem modificar seu tamanho pela perda de tubulina em uma das extremidades e adição na outra extremidade. **B.** O corte transversal de um cílio revela uma parte central formada de microtúbulos, o axonema, que consiste em 2 microtúbulos centrais, circundados por 9 duplas de microtúbulos. Nas duplas, o microtúbulo A é completo, com 13 subunidades, enquanto o microtúbulo B tem 2 ou 3 subunidades comuns com o microtúbulo A. Quando ativados, os braços de dineína ligam-se ao microtúbulo adjacente e promovem o encurvamento dos microtúbulos, desde que exista ATP para fornecer energia. **C.** Centríolos consistem em 9 trincas de microtúbulos unidas por pontes proteicas. Em cada trinca, o microtúbulo A é completo e consiste em 13 subunidades, enquanto os microtúbulos B e C têm subunidades de tubulina em comum.

va-se que os axonemas contêm numerosos microtúbulos, dispostos ordenadamente em espiral (Figura 7.5A); porém, submetendo-se esses protozoários à ação da ureia, molécula que despolimeriza microtúbulos, os axonemas entram em colapso e se retraem (Figura 7.4B). Retirando-se a ureia do meio, os axonemas regeneram-se em menos de meia hora. Durante o colapso dos axonemas, ocorre uma despolimerização dos microtúbulos, com acúmulo das moléculas de tubulina no citoplasma (Figura 7.5B). Com a retirada da ureia, as moléculas de tubulina se repolimerizam e reaparecem os microtúbulos e os axonemas.

▪ *Fármacos que interferem nos microtúbulos*

Diversas moléculas agem nos microtúbulos, interferindo no papel dessas estruturas nos processos celulares dos quais elas participam. Na década de 1930, observou-se que o alcaloide colchicina paralisa a mitose na metáfase, e, desde então, a colchicina tem sido usada nos estudos sobre os cromossomos e a divisão celular. Estudos posteriores mostraram que a colchicina se combina especificamente com os dímeros de tubulina e causa o desaparecimento dos microtúbulos menos estáveis, como os do fuso mitótico. Os microtúbulos dos cílios e

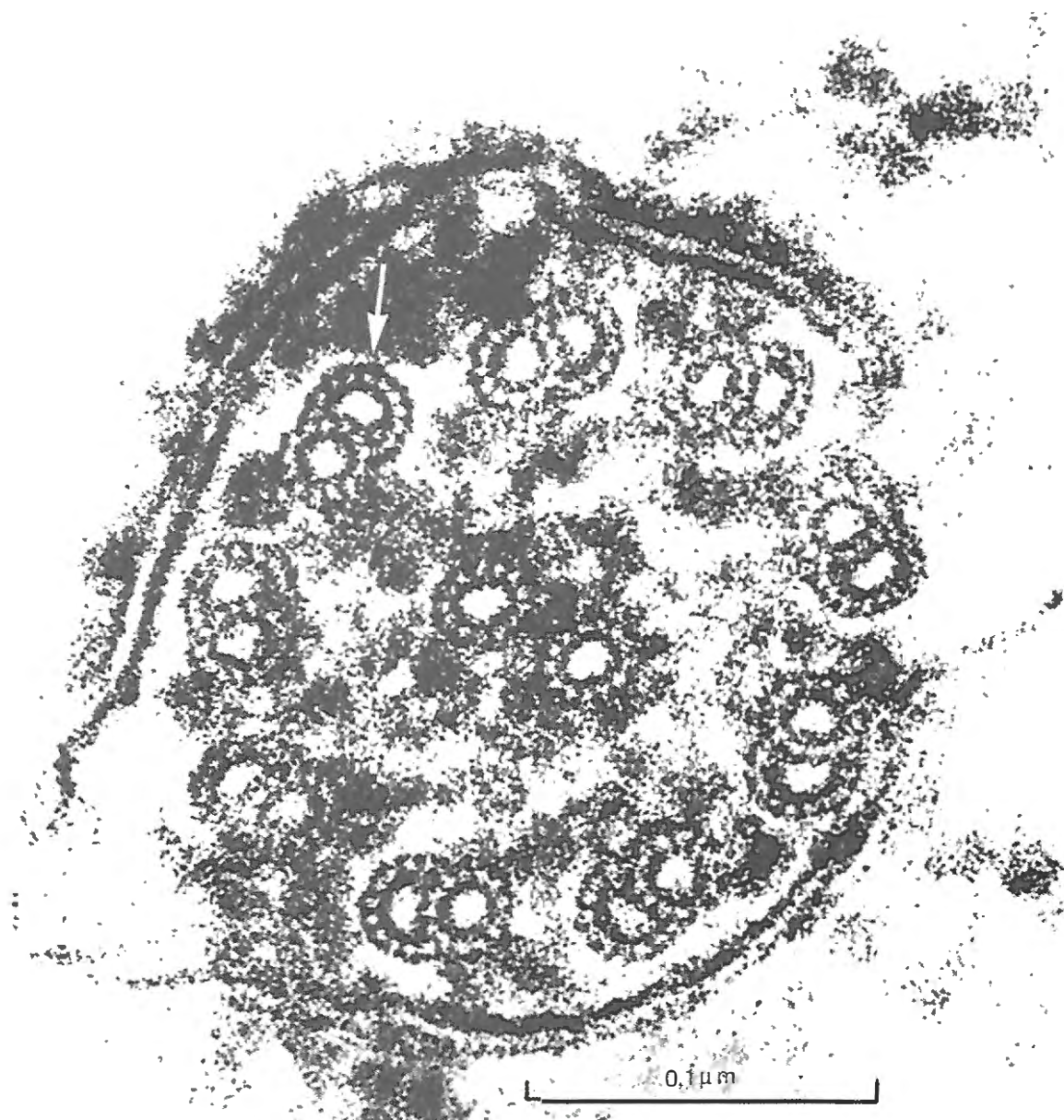



Figura 7.3 ▪ A micrografia eletrônica mostra as moléculas proteicas que constituem os microtúbulos (*seta*). Corte transversal de cauda de espermatozoide de rato fixado em mistura de glutaraldeído e ácido tânico. Esse ácido promove a deposição de ácido ósmico, usado como contraste, na periferia das moléculas proteicas, que aparecem como pontos brancos constituindo a parede dos microtúbulos (*seta*). (Cortesia de V. Mizuhira.)

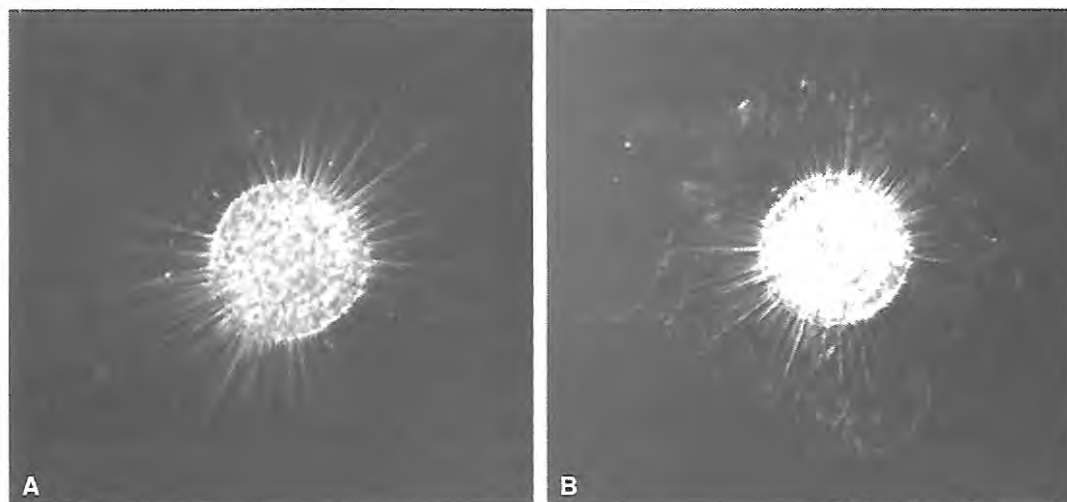



Figura 7.4 ▪ Fotomicrografias de heliozoário que mostram os efeitos de uma solução diluída (0,15 M) de ureia sobre os axonemas. Em **A**, observa-se o protozoário normal e, em **B**, após destruição dos microtúbulos pela ureia. Note o colapso dos axonemas causado pela ureia. Aumento: 2.500×. (Micrografias de Shigenaka, Y.L., Roth, E. and Pihlaja, D.J.: *J. Cell Sci*, **8**:127, 1971. Reproduzidas com permissão.)

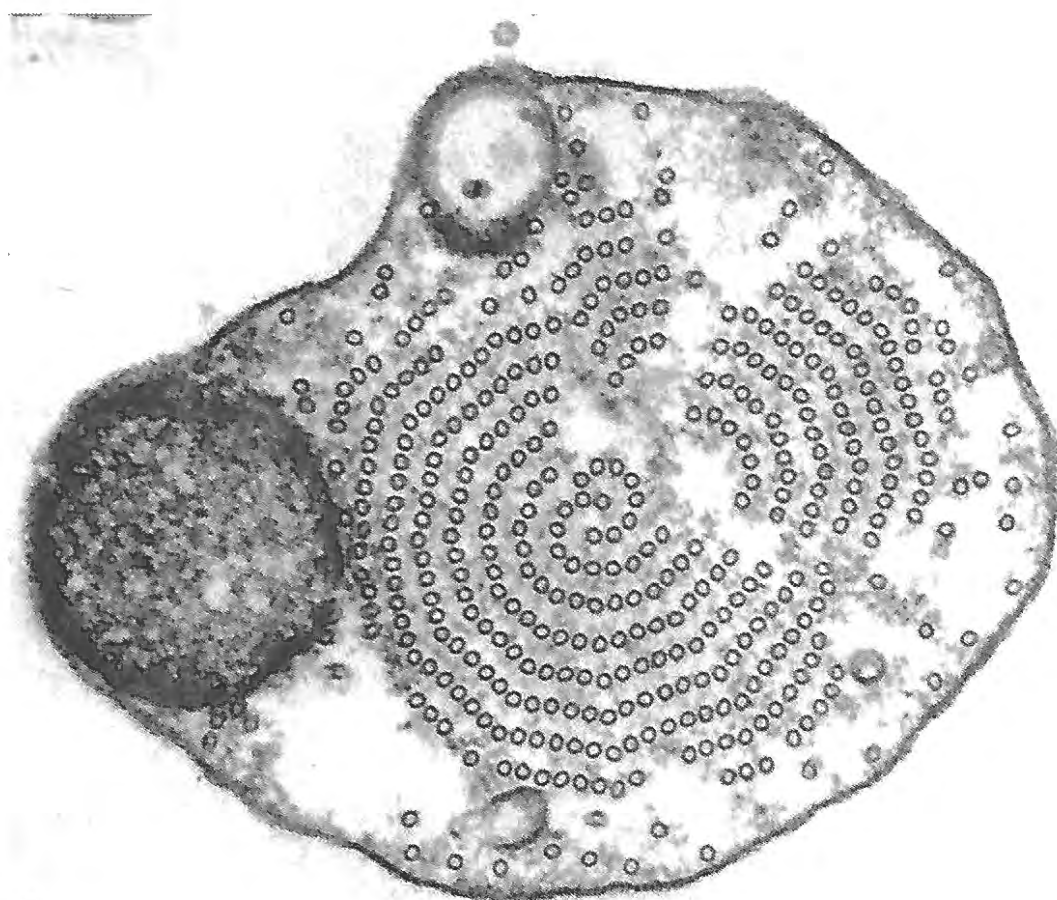
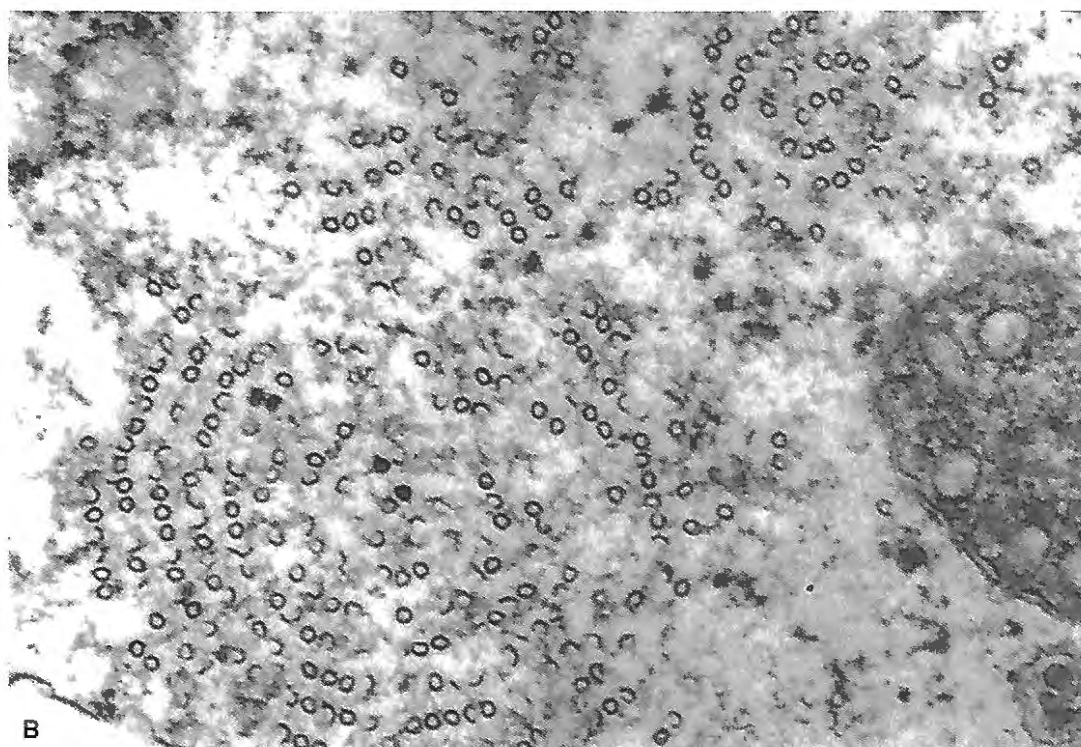



Figura 7.5 ▪ **A.** Eletromicrografia. Corte de axonema de heliozoário normal. Note que, no corte, os microtúbulos mostram um arranjo em espiral. Cada microtúbulo aparece como um anel elétron-denso. **B.** Eletromicrografia. Corte de axonema de heliozoário exposto durante 10 min a uma solução 0,15 M de ureia. Muitos microtúbulos estão destruídos e a organização em espiral desapareceu. (Micrografias de Shigenaka, Y.L., Roth, E. and Pihlaja, D.J.: *J. Cell Sci.*, **8**:127, 1971. Reproduzidas com permissão.)

flagelos são resistentes à colchicina, talvez em razão das proteínas (MAPS) a eles associadas. A colchicina se combina com os dímeros de tubulina, e, quando o complexo colchicina-tubulina é integrado no microtúbulo, impede a adição de novas moléculas de tubulina na extremidade mais (+) do microtúbulo. Como a despolimerização na extremidade menos (–) não cessa, o microtúbulo se desintegra.

Outro alcaloide que interfere nos microtúbulos é o taxol, porém seu efeito molecular é contrário ao da colchicina. O taxol acelera a formação de microtúbulos e os estabiliza, interrompendo a despolimerização. Toda a tubulina do citoplasma se polimeriza em microtúbulos muito estáveis. Desse modo, não há tubulina livre no citoplasma para formar os microtúbulos do fuso e a mitose não se processa. Portanto, os efeitos da colchicina e do taxol sobre a mitose são semelhantes, embora um destrua e o outro estabilize microtúbulos, o que mostra a importância do sistema formado por tubulina livre e tubulina polimerizada.

O taxol é empregado no tratamento de tumores malignos por sua capacidade de impedir a formação do fuso mitótico, atuando como poderoso antimitótico. A colchicina é usada em medicina para o tratamento da gota, desde a antiguidade até nossos dias, embora o mecanismo de ação, nesse caso, não esteja ainda bem esclarecido.

Vincristina e vimblastina, que agem de modo semelhante à colchicina, são fármacos também usados no tratamento dos tumores malignos porque, como a colchicina e o taxol, impedem a formação dos microtúbulos do fuso mitótico, interrompendo a divisão celular.

Microtúbulos dos centríolos

Cada célula contém um par de centríolos, que se localiza próximo ao núcleo e ao aparelho de Golgi, em uma região denominada centrossomo ou centro celular. O centrossomo, que, em algumas células, não contém centríolo, é constituído por um material amorfo de onde se originam microtúbulos. Por isso, o centrossomo é um MTOC (*microtubule organizing center*). Ao microscópio óptico, o centrossomo aparece como um corpúsculo esférico, muito pequeno e demonstrável apenas por colorações especiais.

O microscópio eletrônico mostrou que cada centríolo é um cilindro medindo 150 nm de diâmetro por 300 a 500 nm de comprimento. A posição dos centríolos de cada par é muito típica e constante, pois eles se dispõem sempre de modo que um centríolo forme um ângulo reto com o outro.

Cada centríolo é constituído por um material amorfo no qual estão colocados 27 microtúbulos. Esses microtúbulos dispõem-se em 9 feixes, cada um deles com 3 microtúbulos paralelos. Os 3 microtúbulos de cada feixe são presos entre si (Figura 7.2).

Os corpúsculos basais, nos quais se inserem os cílios e os flagelos, têm a mesma estrutura dos centríolos.

Filamentos de actina

Esses filamentos (Figura 7.6) são formados por duas cadeias em espiral de monômeros globosos da proteína actina G, que se polimerizam lembrando dois colares de pérolas enrolados, formando uma estrutura quaternária fibrosa (actina F). São filamentos finos, com 5 a 7 nm de diâmetro. Frequentemente, os filamentos de actina se agregam para formar feixes mais grossos. Muito abundante no músculo, a actina é encontrada também, embora em menor quantidade, no citoplasma de todas as células, onde constitui 5 a 30% das proteínas totais do citoplasma. Os filamentos de actina participam da formação de uma camada imediatamente por dentro da membrana plasmática, chamada córtex celular. O córtex celular é importante para reforçar a membrana plasmática, que é muito frágil, e participa dos movimentos da célula, como os movimentos ameboides e a fagocitose, por exemplo.

Existem diversos tipos de actina, constituindo uma família de proteínas extremamente conservadas durante a evolução. Mais de 80% das sequências de aminoácidos são exatamente iguais em todos os tipos de actina. As diferenças na sequência de aminoácidos estão localizadas na extremidade $-NH_2$ da molécula, e parece ter influência muito pequena na velocidade da polimerização dos monômeros de actina.

Diversos fármacos que influenciam na estrutura dos filamentos de actina, como as citocalasinas e as faloidinas (ambas extraídas de fungos), interferem nos movimentos celulares, e têm sido usadas em experimentos sobre esses movimentos. As citocalasinas se combinam com as moléculas de actina e impedem a polimerização dessas moléculas para formar filamen-

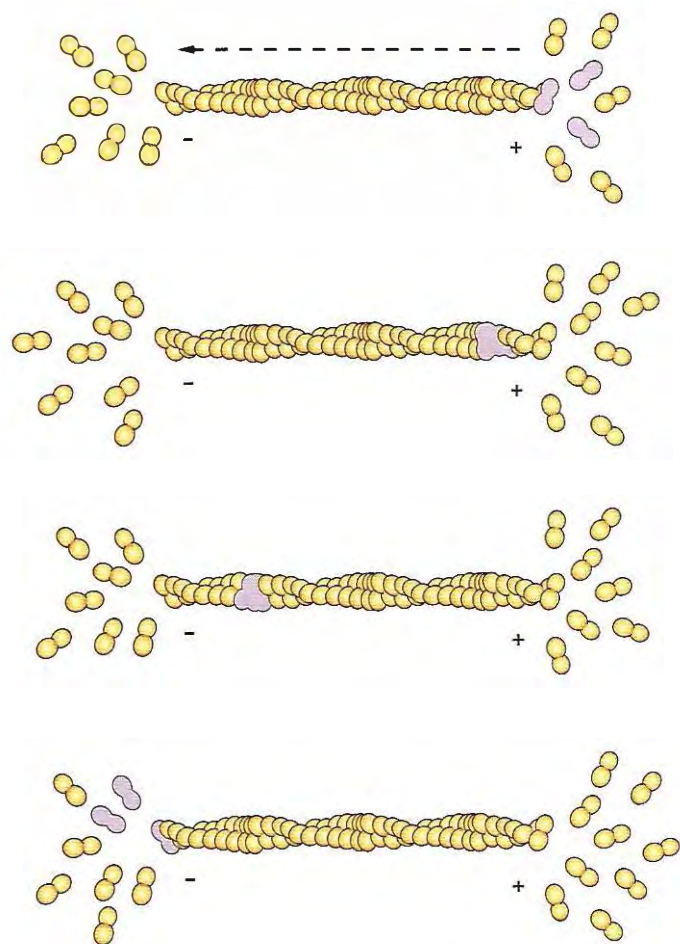



Figura 7.6 ▪ O desenho mostra que o filamento de actina é uma estrutura dinâmica, recebendo subunidades por uma extremidade, denominada extremidade mais (+), e perdendo subunidades pela extremidade menos (–). Esse dinamismo permite que o filamento se adapte com grande rapidez às necessidades da célula. Somente por exceção, como na fibra muscular estriada, o filamento de actina é estável.

tos. As faloidinas se combinam lateralmente com os filamentos de actina, estabilizando-os. Tanto as citocalasinas como as faloidinas impedem os movimentos dependentes da actina. Como no caso dos microtúbulos, tanto a destruição como a estabilização dos filamentos de actina têm o mesmo efeito, mostrando que o dinamismo entre os monômeros de actina dos filamentos e os do *pool* citosólico é essencial para a função desses filamentos. Todavia, nem todos os filamentos de actina são igualmente sensíveis a esses fármacos. Os filamentos das células não musculares são os mais sensíveis.

Filamentos intermediários

São chamados assim por seu diâmetro de 8 a 10 nm, intermediário entre o dos filamentos de miosina, que são mais grossos, e o dos filamentos de actina, mais finos.

Os filamentos intermediários (Figuras 7.7 e 7.8) são mais estáveis do que os microtúbulos e os filamentos de actina, e não são constituídos por monômeros precursores que constantemente se agregam e se separam, em equilíbrio com um *pool* citoplasmático. Quando a célula é rompida experimentalmente, os microtúbulos e os filamentos de actina se solubilizam, mas 99% dos filamentos intermediários permanecem intactos. Uma vez formados, os filamentos intermediários permanecem por longo tempo no citoplasma. Esses filamentos não têm participação direta na contração celular, nem nos movimentos de organelas, sendo primordialmente elementos estruturais.

Os filamentos intermediários são abundantes nas células que sofrem atrito, como as da epiderme, onde se prendem a especializações da membrana plasmática, denominadas desmossomos, que unem as células umas às outras. Também são frequentes nos axônios, que são prolongamentos das células nervosas ou neurônios, e em todos os tipos de células musculares. As células que se multiplicam muito frequentemente, como nas culturas e nos embriões muito jovens, são desprovidas de filamentos intermediários. Esses filamentos também estão ausentes nas células que produzem mielina no sistema nervoso central (oligodendrócitos). Como será estudado logo a seguir, os filamentos intermediários dos fibroblastos são constituídos pela proteína vimentina. Foi observado, experimentalmente, que a injeção intracelular de anticorpo contra vimentina, embora destrua os filamentos intermediários dos fibroblastos, não tem qualquer efeito aparente sobre essas células, que continuam se dividindo normalmente. Esse experimento, mais a observação de que células embrionárias jovens não contêm filamentos intermediários, faz supor que as funções desses filamentos dizem respeito às atividades especializadas das células diferenciadas.

Todos os filamentos intermediários têm a mesma estrutura, sendo constituídos pela agregação de moléculas alongadas, cada uma formada por três cadeias polipeptídicas enroladas em hélice. Ao contrário dos microtúbulos e dos filamentos de actina, que, em todas as células, são constituídos pelas proteínas globulares tubulina e actina, respectivamente, os filamentos intermediários são formados por diversas proteínas fibrosas (moléculas muito alongadas): queratina, vimentina, proteína ácida fibrilar da glia, desmina, lamina e proteínas dos neurofilamentos (Tabela 7.1). Essas proteínas se agregam espontaneamente, sem necessidade de energia, para montar os respectivos filamentos intermediários. Vimentina, proteína

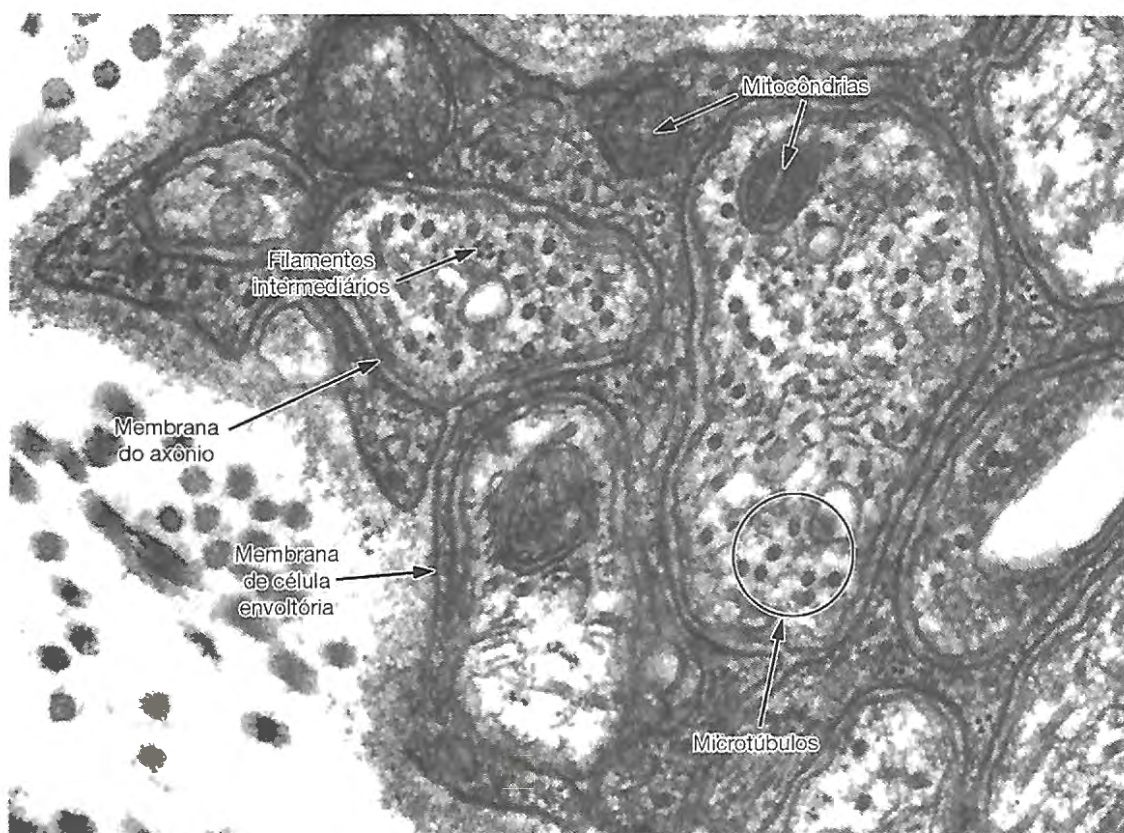



Figura 7.7 ▪ A eletromicrografia mostra microtúbulos e filamentos intermediários. Corte de prolongamentos (axônios) de células nervosas humanas. Aumento: 80.000x.

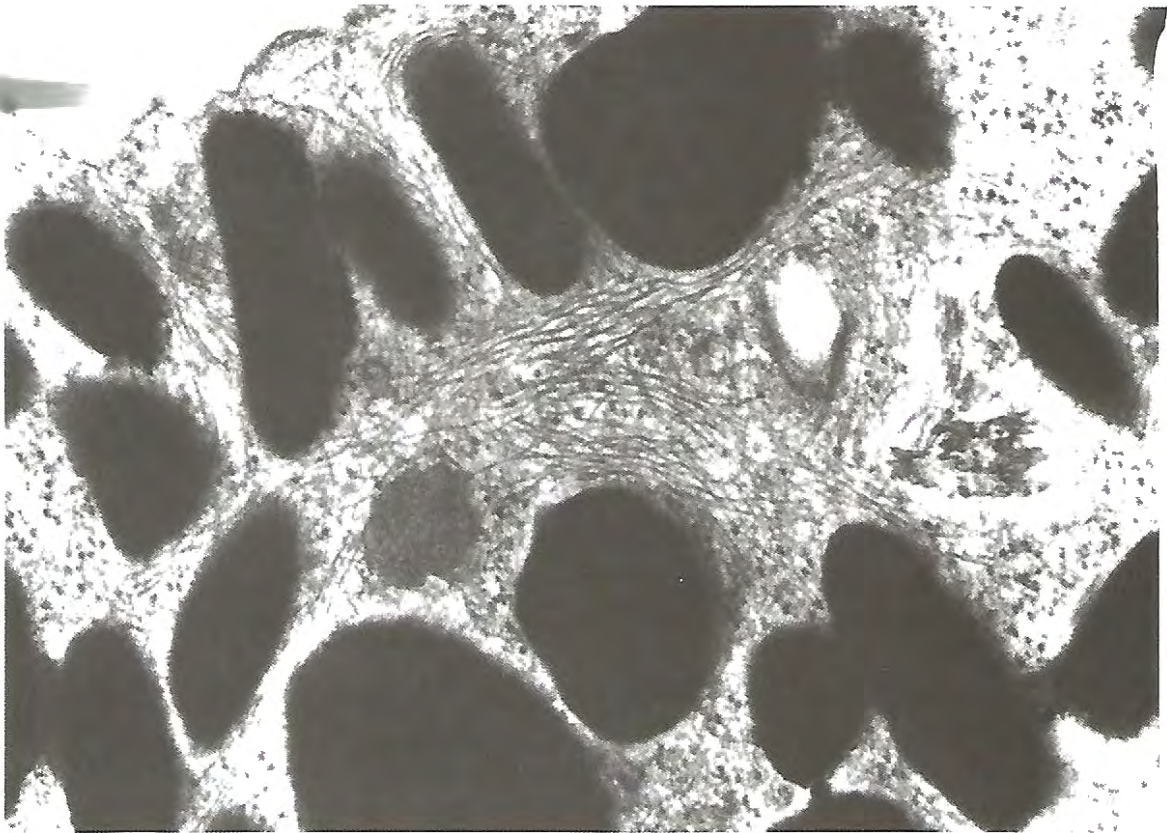



Figura 7.8 ▪ Eletromicrografia de melanócito. Entre os grânulos escuros de melanina, aparecem numerosos filamentos intermediários. Aumento: 50.000x.

ácida fibrilar da glia e desmina são proteínas muito parecidas e, por isso, são frequentes os filamentos intermediários de vimentina mais essas outras proteínas.

Os filamentos intermediários constituídos de queratina são encontrados exclusivamente nas células epiteliais e em estruturas delas derivadas, como pelos, unhas e chifres. Existem diversos tipos diferentes de queratina, codificadas por igual número de genes.

> Já foi identificada uma doença humana, rara, originada de mutação dos genes que codificam as queratinas das células da camada basal da epiderme. A rede de filamentos intermediários de queratina nessas células torna-se frágil. Em consequência, a camada basal da epiderme se rompe ao menor atrito, originando espaços entre as células. Esses espaços se enchem de líquido oriundo do tecido conjuntivo da derme, formando-se bolhas.

Os filamentos intermediários formados pela proteína vimentina são os mais frequentes, encontrados nos fibroblastos e em todas as células de origem mesenquimal, isto é, derivadas do tecido embrionário denominado mesênquima. São exemplos de células mesenquimais os fibroblastos, macrófagos, células musculares lisas e muitas outras.

A desmina é encontrada nos filamentos intermediários das células musculares lisas e nas linhas Z das células musculares estriadas esqueléticas e cardíacas.

Os astrócitos e células de Schwann, constituintes do tecido nervoso, apresentam filamentos intermediários de proteína ácida fibrilar da glia ou GFAP (*glial fibrillary acidic protein*).

Os neurofilamentos são constituintes do corpo celular e dos prolongamentos dos neurônios, sendo particularmente abundantes nos axônios.

Existem três variedades da proteína lamina, denominadas A, B e C, que participam da constituição da lâmina nuclear, uma estrutura em forma de rede que reforça a superfície interna do envoltório nuclear. Assim, ao contrário das outras proteínas de filamentos intermediários, que são citoplasmáticas, a lamina é um componente do núcleo celular.

Tabela 7.1 ▪ Proteínas que constituem os filamentos intermediários.

Proteína e peso molecular expressos em quilodáltons	Localização
Queratinas (mais de 20 tipos, 40 kDa–70 kDa)	Células epiteliais e estruturas formadas por elas, como unhas, pelos e chifres
Vimentina (54 kDa)	Maioria das células originadas do mesênquima embrionário; algumas vezes é produzida apenas transitoriamente durante o desenvolvimento embrionário
Desmina (53 kDa)	Células musculares lisas, esqueléticas e do miocárdio
Proteína ácida fibrilar da glia (50 kDa)	Dois tipos de células da glia: astrócitos e células de Schwann
Proteínas dos neurofilamentos (60 kDa_130 kDa)	Corpo celular e prolongamentos dos neurônios (principalmente axônios)
Laminas A, B e C (65 kDa–75 kDa)	Lâmina nuclear, estrutura em grade que reforça internamente o envoltório nuclear

Os filamentos intermediários são específicos para os diversos tecidos, o que tem sido utilizado para caracterizar, nas biopsias de tumores e suas metástases, os tecidos de origem, informação muitas vezes importante para orientar o tratamento. Por exemplo, a detecção de queratina por imunocitoquímica indica que o tumor é de origem epitelial e a variedade de queratina observada pode informar quanto ao tipo de epitélio onde se formou o tumor.

As micrografias eletrônicas têm mostrado que os filamentos intermediários podem ligar-se aos microtúbulos, filamentos de actina, mitocôndrias, grupos de ribossomos, envoltório nuclear e membrana plasmática, por meio de pontes delgadas formadas por moléculas proteicas. A associação com microtúbulos é particularmente evidente em determinados prolongamentos (axônios) das células nervosas. A dissolução dos microtúbulos de fibroblastos, por meio da colchicina, modifica a posição dos filamentos intermediários de vimentina. Enquanto os microtúbulos estão intactos, os filamentos de vimentina percorrem todo o citoplasma, mas, após a desmontagem dos microtúbulos pela colchicina, os filamentos de vimentina, demonstráveis por imunofluorescência, aglutinam-se em volta do núcleo do fibroblasto. Isso indica que os microtúbulos influem na disposição dos filamentos intermediários.

Nas células até o momento estudadas a esse respeito, como os linfócitos e os fibroblastos, foi observado que os filamentos intermediários se organizam em um sistema amplo no citoplasma, indo desde o envelope nuclear até a membrana citoplasmática.

Movimentos celulares

O exame microscópico da célula viva mostra que ela se contrai, se expande e se movimenta em grau variável. Mostra ainda que suas organelas não são fixas, mas deslocam-se de um local para outro no interior da célula. A movimentação e o posicionamento intracelular das organelas e grânulos diversos estão relacionados com as funções celulares. São exemplos os movimentos cromossômicos na mitose, os movimentos das vesículas de secreção, das mitocôndrias e muitos outros.

O estudo da movimentação celular é um exemplo da importância das forças fracas de interação macromolecular na vida das células. De fato, nos processos que serão estudados a seguir, fica claro como essas interações, individualmente fracas, quando em grande número podem gerar forças fortes, facilmente reversíveis, e de potência tal que permitem a um homem levantar pesos de mais de 100 kg, pela contração simultânea de grande número de fibras musculares esqueléticas.

Os filamentos de actina e de miosina, os microtúbulos e as proteínas motoras são responsáveis pela maioria dos movimentos celulares. Entre as moléculas desses componentes se estabelecem ligações químicas fracas e reversíveis, não covalentes, responsáveis pela força motriz.

Para fins didáticos, os movimentos celulares podem ser divididos em dois grupos.

▸ **Movimentos que causam modificação na forma das células.** Esses processos são ilustrados pela contração das células musculares, células mioepiteliais (células contráteis presentes nas glândulas exócrinas e que auxiliam a expelir a secreção) células endoteliais, células mioides (presentes nos testículos) e outras. O movimento ameboide, pelo qual células livres como os macrófagos e leucócitos se locomovem, e a divisão celular ou citocinese que ocorre no fim da mitose, também estão incluídos nesse grupo.

▸ **Movimentos que não causam modificação na forma das células.** Esse grupo inclui todos os processos de transporte intracelular de material não acompanhado por deformação celular, como, por exemplo, nas correntes citoplasmáticas ou ciclose observada nas células vegetais. É o que ocorre também no transporte de material ao longo dos prolongamentos das células nervosas, transporte de grânulos de pigmento nas células pigmentares e na extrusão das vesículas de secreção das células glandulares.

A maioria dos movimentos celulares se deve ao deslizamento de estruturas macromoleculares umas sobre as outras

O mecanismo de movimentação mais difundido nas células eucariontes se deve ao deslizamento de fibrilas de actina sobre fibrilas de miosina; porém, os movimentos dos cílios e flagelos e o transporte intracelular de partículas citoplasmáticas são devidos ao deslizamento de proteínas motoras sobre as macromoléculas de tubulina, que constituem os microtúbulos.

Embora os filamentos de actina participem ativamente na movimentação celular, eles têm também funções estruturais. É o caso dos filamentos de actina dos microvilos. Quando esses filamentos são despolimerizados (pela ação de altas pressões, por exemplo) os microvilos desaparecem, reaparecendo quando cessa a pressão e a actina se repolimeriza, reconstituindo os filamentos.

A célula muscular estriada é altamente especializada na transformação de energia química em energia mecânica

A célula muscular estriada, por ser especializada e apresentar uma estrutura altamente diferenciada no sentido de produzir movimento, foi o primeiro sistema analisado em profundidade. Há dois tipos de músculo estriado: o esquelético e o cardíaco. O primeiro é constituído por células muito grandes, multinucleadas, constituindo verdadeiros sincícios, e que geralmente se inserem nos ossos por meio dos tendões. O músculo estriado cardíaco é o principal componente do miocárdio, camada média e responsável pela contração involuntária, rítmica e contínua do coração. Suas células são menores, têm geralmente apenas um núcleo, prendem-se umas às outras por estruturas de aderência e se comunicam por meio de junções comunicantes que sincronizam as contrações do miocárdio. Em razão da forma cilíndrica alongada, as células musculares muitas vezes são chamadas fibras musculares.

Na vida embrionária, várias células musculares primordiais ou precursoras se fundem, formando sincícios (sincício é uma estrutura constituída por citoplasma e muitos núcleos) que se alongam, originando as fibras musculares estriadas esqueléticas. Essas fibras agrupam-se e suas extremidades se prendem a tendões inseridos nos ossos (Figura 7.9A). A análise dessas

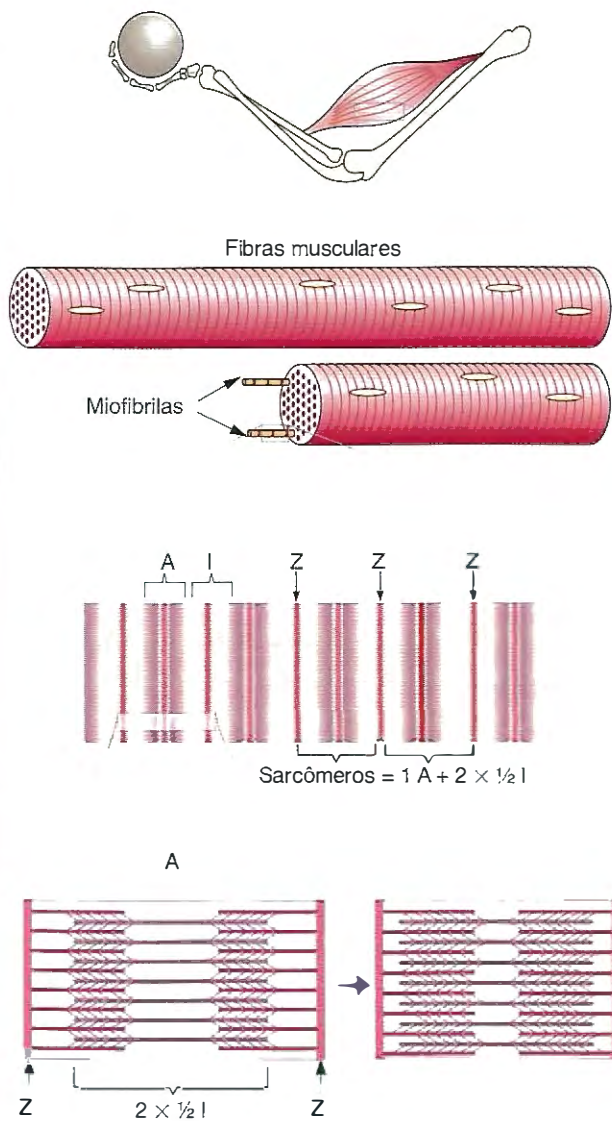



Figura 7.9 ▪ Ilustração da estrutura do tecido muscular estriado esquelético e do mecanismo de contração. O músculo (**A**) é formado por feixes de fibras musculares. Cada fibra é um sincício que contém miofibrilas (**B**). Cada miofibrila é formada por unidades que se repetem, os sarcômeros (**C**), limitados lateralmente pelas estrias Z. Em **D**, a ultraestrutura de cada sarcômero mostra os filamentos finos de actina que imbricam com os filamentos grossos de miosina. Os filamentos grossos formam uma banda escura, a banda A. De cada lado da banda A, o desenho mostra uma semibanda I, clara, e a estria Z. *À esquerda*, sarcômero de músculo distendido; *à direita*, sarcômero de músculo contraído. A contração se deve ao deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos. Observe as pontes que se estabelecem entre os filamentos.

fibras ao microscópio óptico (microscópio de luz) mostra que elas contêm um feixe intracitoplasmático de delgadas estruturas cilíndricas – as miofibrilas (Figura 7.9B). Cada miofibrila apresenta alternadamente faixas claras ou bandas I, e faixas escuras ou bandas A.

O sarcômero é a unidade funcional das fibras musculares estriadas esqueléticas e cardíacas

O estudo das miofibrilas ao microscópio eletrônico revela que elas são formadas por unidades que se repetem, os sarcômeros. Cada sarcômero, por sua vez, é limitado por duas estrias finas e elétron-densas, as estrias Z, estruturas que contêm desmina. Sarcômero, portanto, é a porção da miofibrila limitada por duas estrias Z consecutivas, sendo formado por uma banda A e dois segmentos da banda I cortada ao meio pela estria Z (Figura 7.9C).

A análise mais minuciosa ao microscópio eletrônico revelou que o sarcômero se compõe basicamente de dois tipos de filamentos (Figura 7.9D). Um deles é fino, insere-se nas estrias Z com a participação da proteína α-actinina, dirige-se medialmente, não atingindo, porém, o centro do sarcômero. O filamento fino é constituído, sobretudo, por monômeros globosos de uma proteína chamada actina. Esses monômeros se polimerizam em cadeias que se enrolam em dupla hélice (Figura 7.10) à qual se associam as proteínas tropomiosina e troponina (Figura 7.11). Em determinadas circunstâncias, a actina se despolimeriza, apresentando-se sob a forma de moléculas globosas isoladas (actina G). Quando essas moléculas estão polimerizadas, formando filamentos, recebem o nome de actina F (Figura 7.10). Cada monômero de actina tem um *locus* químico que reage com a miosina. As proteínas actina, tropomiosina e troponina se associam como ilustrado na Figura 7.12.

Os filamentos grossos situados no centro do sarcômero, sem atingirem lateralmente as estrias Z, são constituídos por feixes de moléculas proteicas fibrilares de miosina. Cada molécula de miosina é constituída por dois longos polipeptídios enrolados que assumem a forma de um bastão longo com duas cabeças globulares em uma das suas extremidades. O filamento grosso de miosina é formado pela associação de centenas de moléculas de miosina dispostas em várias alturas, formando um feixe do qual as cabeças da miosina provocam saliência (Figura 7.10). Cada um desses espessamentos, ou cabeças de miosina, contém uma região que se combina de maneira reversível com a actina (Figura 7.12).

O deslizamento dos filamentos de actina e miosina encurta os sarcômeros e causa a contração muscular

A contração muscular ocorre graças ao deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina para dentro do sarcômero, com o consequente encurtamento da distância entre as estrias Z. A força motriz para esse movimento vem das ligações entre a actina e as cabeças globulares da miosina, que periodicamente se dobram, gerando um deslocamento lateral, seguido por uma ruptura e posterior reconstituição da ligação (Figura 7.12). Dessa maneira, os filamentos de actina se deslocam em relação aos de miosina, de modo análogo ao que ocorre quando uma taturana se desloca ao longo de um ramo de árvore. Os pés da taturana representariam as cabeças globulares da miosina que se dobram durante a contração muscular (Figura 7.12). Comparando-se o músculo contraído com o distendido, observa-se que, no primeiro, os filamentos finos (filamentos de actina) se tornam menos visíveis, devido ao seu deslizamento por entre os filamentos grossos, e as linhas Z se aproximam, encurtando o sarcômero (Figuras 7.9, 7.13 e 7.14).

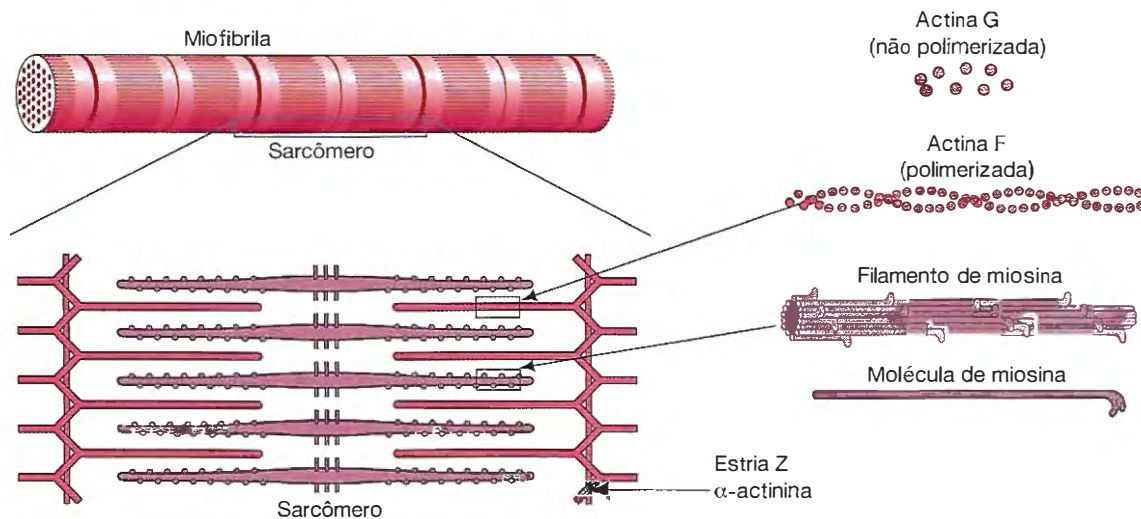



Figura 7.10 ▪ Ilustração da disposição e da estrutura dos filamentos finos (filamentos de actina) e grossos (filamentos de miosina) no sarcômero. O desenho mostra, também, que a estria Z contém a proteína α-actinina. *À esquerda*, os componentes do sarcômero; *à direita*, a estrutura molecular desses componentes.

▪ A liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático liso transmite para o interior da fibra muscular estriada o estímulo contrátil recebido pela membrana

Como ocorre o desencadeamento da contração dos músculos estriados? No músculo em repouso, a tropomiosina encontra-se em íntimo contato com a actina, cobrindo essa molécula e impedindo o contato das cabeças da miosina com a actina. Quando o músculo é estimulado, o aumento de permeabilidade induzido pelo estímulo na membrana celular se transmite ao retículo endoplasmático liso, que libera para o citosol íons cálcio contidos no seu interior. Esses íons agem sobre a troponina promovendo sua deformação molecular, o que causa a separação entre a tropomiosina e a actina. Esse movimento molecular expõe os grupamentos da actina que reagem com as cabeças da miosina, estabelecendo-se assim pontes entre esses dois filamentos (Figura 7.12). Na etapa seguinte, o encurvamento da cabeça globular da miosina,

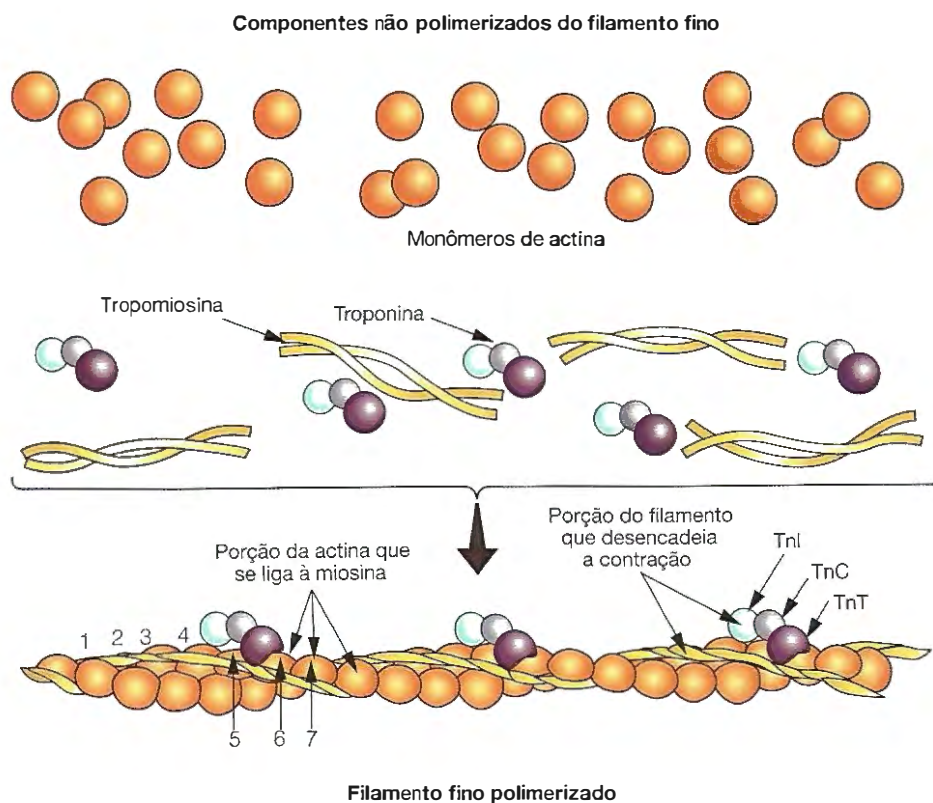



Figura 7.11 ▪ Figura esquemática que ilustra como as proteínas actina, tropomiosina e troponina se associam para formar os filamentos finos. Na parte de cima do desenho, os componentes livres e, embaixo, polimerizados nos filamentos. Observe que cada molécula de tropomiosina se prende intimamente a sete monômeros da actina. A troponina liga a actina à tropomiosina. Quando aumenta a concentração de íons Ca^{2+}, a troponina se deforma e afasta a molécula de tropomiosina da de miosina. A troponina é constituída por três subunidades denominadas de TnL, TnC e TnT.

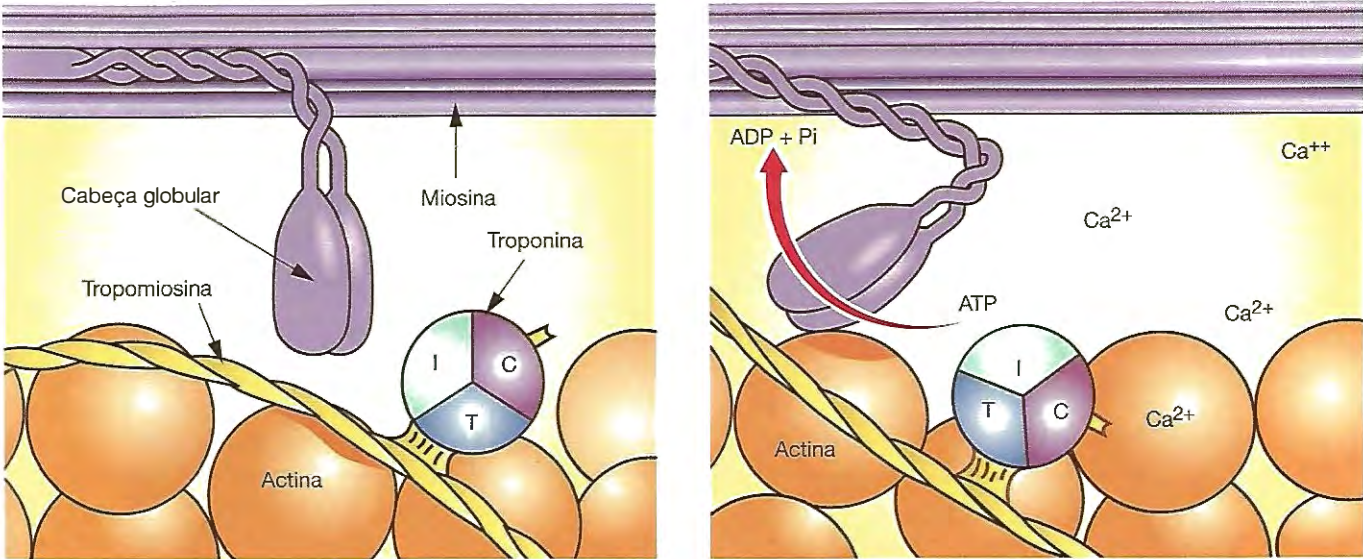



Figura 7.12 ▪ O esquema ilustra o processo molecular da contração muscular. O Ca^{2+} liberado do retículo endoplasmático liso prende-se à troponina que modifica sua forma, deslocando a tropomiosina e expondo as áreas receptoras da actina (em riscado), que, então, ligam-se às cabeças globulares da miosina. Em uma segunda etapa, ocorre hidrólise de ATP a ADP, com liberação da energia utilizada para dobrar a molécula de miosina. O processo de dobramento da molécula da miosina, que gera o deslizamento da actina sobre a miosina, se processa em duas regiões da molécula. Consequentemente, os filamentos finos (actina) deslizam sobre os grossos (miosina), promovendo o encurtamento dos sarcômeros e a contração muscular. (Reproduzido, com autorização, de Ganong, W.F.: *Review of Medical Physiol*, 14th ed. Lange Publications, 1989.)

consumindo energia do ATP, desloca o filamento de actina (Figura 7.12), encurtando o sarcômero e provocando a contração da fibra muscular estriada (Figuras 7.13 e 7.14).

Em todas as fibras musculares estriadas, tanto esqueléticas como cardíacas, a contração se dá pelo processo descrito de encurtamento dos sarcômeros. Esses dois tipos de fibras musculares estriadas apresentam muitas semelhanças, sendo constituídas por sarcômeros delimitados por estrias Z e que apresentam as mesmas bandas A e bandas I.

Nas células musculares estriadas, as mitocôndrias, organelas produtoras de ATP, são numerosas e localizam-se nas proximidades das miofibrilas, oferecendo evidente vantagem funcional, pois ATP é o combustível utilizado para a contração.

As células musculares lisas são fusiformes, menores do que as fibras estriadas, e são encontradas principalmente na parede do útero, estômago, intestinos, vasos sanguíneos e muitos outros órgãos. Essas fibras lisas se contraem e se relaxam mais lentamente, funcionando de modo diferente

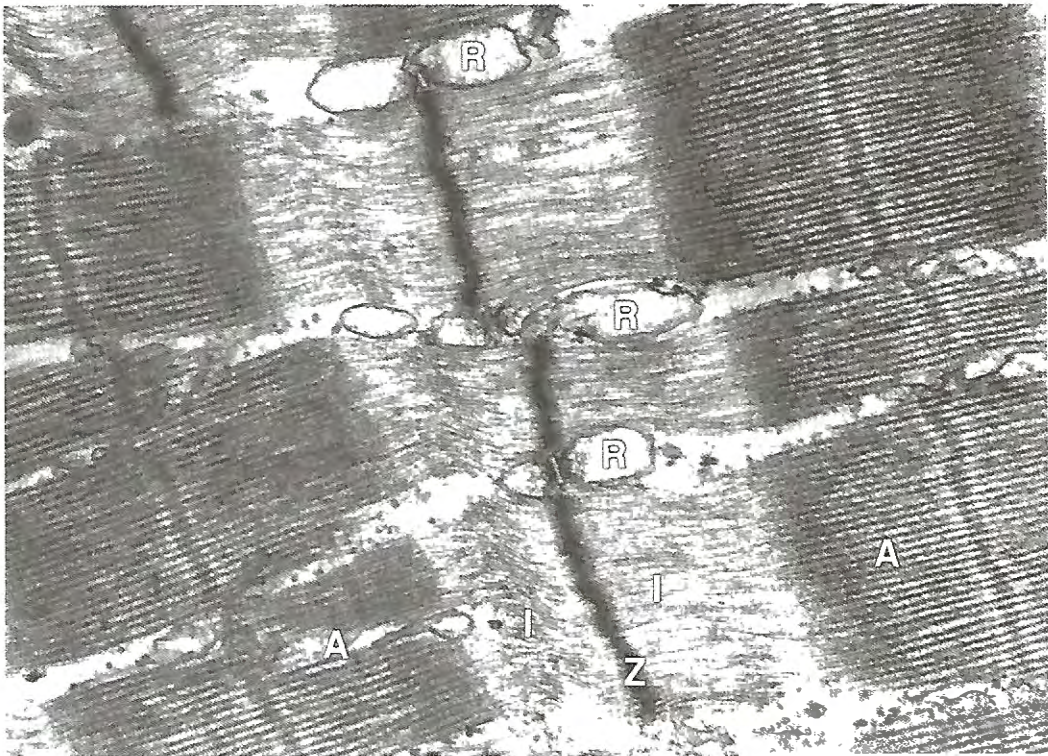



Figura 7.13 ▪ Eletromicrografia de músculo estriado esquelético em estado de distensão. No centro, escurecida, a estria Z ladeada pelos filamentos finos (actina) e, mais lateralmente, pelos grossos (miosina). Em R, o retículo endoplasmático liso, no qual é acumulado o cálcio no músculo em repouso. Aumento: 100.000×.

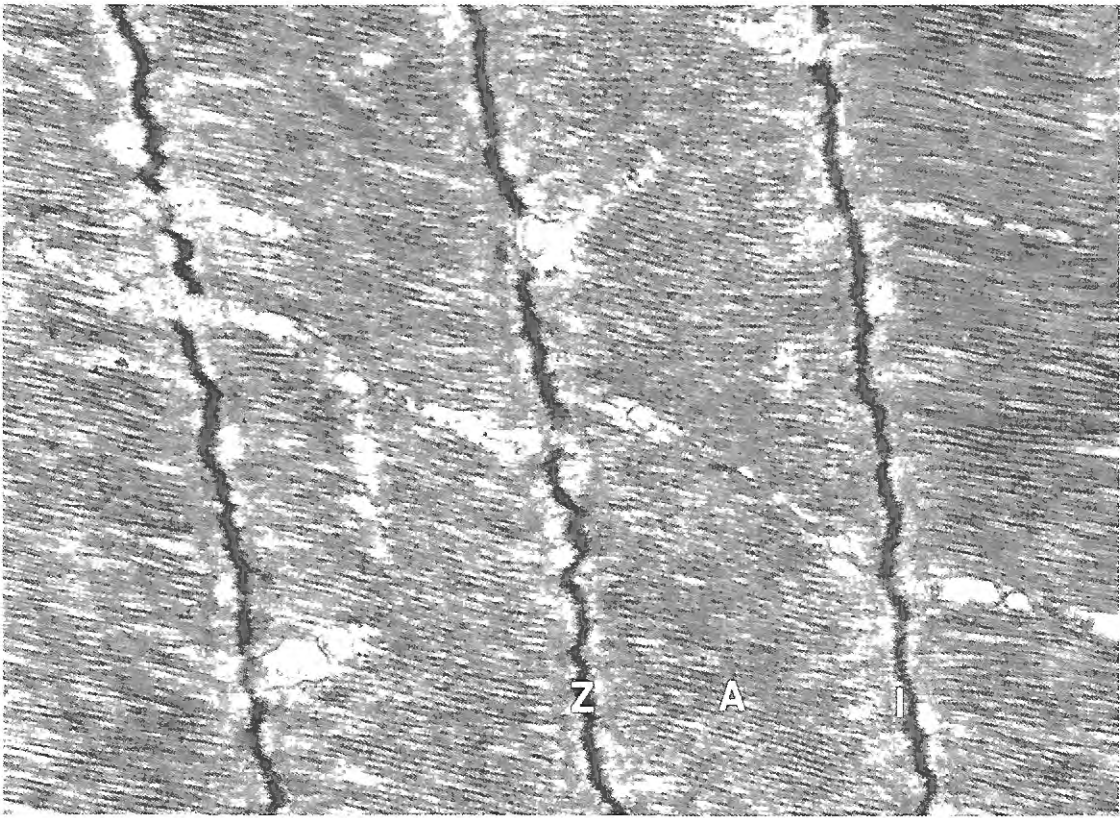



Figura 7.14 ▪ A eletromicrografia mostra a ultraestrutura de músculo estriado esquelético em estado de contração. Os filamentos finos deslizaram por entre os filamentos grossos, desaparecendo a zona clara (banda I) que ladeava as estrias Z. Aumento: 45.000×.

das fibras estriadas, mesmo porque elas não contêm miofilamentos tão bem organizados como os das fibras estriadas. Os feixes de miofilamentos das células musculares lisas não apresentam o arranjo paracristalino observado nas fibras estriadas. Eles se cruzam no citoplasma, formando uma teia em três dimensões. Esses feixes contêm filamentos com 5 a 7 nm de diâmetro, formados por actina e tropomiosina, e filamentos de miosina com 12 a 16 nm de espessura.

Nas fibras musculares lisas, a contração se deve também a um mecanismo de deslizamento de filamentos de actina sobre os de miosina, parecido com o que ocorre no músculo estriado. A contração geralmente se inicia pela abertura de canais de Ca^{2+} da membrana plasmática, por estímulo nervoso e pelo aumento da concentração desse íon no citosol, onde ela normalmente é muito baixa; mas, no músculo liso, a reação transitória da miosina com a actina depende da fosforilação da miosina, sem participação da troponina. Os íons Ca^{2+}, quando em excesso no citosol da célula muscular lisa, formam um complexo com a calmodulina, uma proteína com alta afinidade para esse íon e que participa também da contração em células não musculares. O complexo calmodulina-Ca^{2+} ativa a cinase da cadeia leve da miosina, uma enzima que catalisa a fosforilação da miosina, e essa fosforilação causa uma deformação nas cabeças globulares da miosina, que empurram os filamentos finos de actina, determinando o encurtamento dos miofilamentos. Posteriormente, fosfatases removem os radicais fosfato presos à miosina, bombas de Ca^{2+} retiram os íons Ca^{2+} do citosol por processo ativo, e o músculo volta ao estado de relaxamento.

As células musculares lisas apresentam ainda uma teia tridimensional de filamentos intermediários, principalmente de desmina, ocorrendo também vimentina nas células musculares lisas da parede dos vasos sanguíneos. Outra característica das células musculares lisas em geral é a presença dos chamados corpos densos, situados seja associados à face interna da membrana plasmática, ou então dispersos no interior do citoplasma. Esses corpos densos contêm a proteína α-actinina e outras proteínas também encontradas nas linhas Z dos músculos estriados; por isso, os corpos densos são considerados equivalentes dessas linhas, embora apresentando uma organização muito diferente. Como os filamentos finos e os filamentos intermediários no músculo liso se inserem, por uma extremidade, nos corpos densos citoplasmáticos e, pela outra, nos corpos densos da membrana, a contração devida ao deslizamento causa uma redução no tamanho da célula muscular lisa inteira. Nos músculos, elas estão presas umas às outras, principalmente pelas fibras reticulares (Capítulo 12), de maneira que a contração de apenas algumas células causa a contração do músculo como um todo.

A contração e o relaxamento do músculo liso são lentos porque as enzimas para adição e remoção de radicais fosfato à molécula de miosina precisam se difundir pelo citosol. Por outro lado, sendo o mecanismo de contração das células musculares lisas um processo muito menos especializado, pode ser desencadeado por inúmeros estímulos além do estímulo trazido pelos nervos. Assim, as células musculares lisas, dependendo dos receptores que contêm, podem se contrair pela ação de epinefrina, serotonina, prostaglandinas, angioten-

sina, ocitocina e numerosas outras moléculas. Admite-se que o mecanismo de contração que atua nas células não musculares em geral e nas células musculares lisas é um processo primitivo que, durante a evolução, deu origem ao mecanismo altamente especializado e eficiente de contração dos músculos estriados esqueléticos e cardíaco.

Outros exemplos da interação de actina e miosina

A seguir serão citados outros exemplos da interação actina-miosina, proteínas muito difundidas nos vários tipos celulares. A actina apresenta alta diversidade funcional, que resulta na sua capacidade de interagir com várias proteínas presentes na maioria das células, chamadas coletivamente de proteínas que se ligam à actina. Ao se ligarem à actina, essas proteínas desempenham papéis diferentes: por exemplo, a filamina liga filamentos de actina entre si, a espectrina prende a actina à membrana plasmática, a fimbrina forma feixes de actina e a minimiosina possibilita o deslizamento de partículas sobre moléculas de actina. Há outras proteínas que se associam à actina, além dessas citadas como exemplos. No organismo dos mamíferos existem vários tipos de células não musculares que apresentam acentuada capacidade de contração; a seguir serão mencionados três exemplos: (1) as células mioepiteliais, células estreladas que abraçam as porções secretoras de algumas glândulas exócrinas, como as glândulas mamárias, salivares e sudoríparas; (2) as células mioides (Figura 7.15), que envolvem os túbulos seminíferos do testículo; e (3) as células endoteliais (Figura 7.16) dos capilares sanguíneos. Esses três tipos celulares apresentam muitos filamentos citoplasmáticos de actina, que, junto com a miosina, são responsáveis pela atividade contrátil observada.

▸ **Citocinese.** A separação das células-filhas no fim da mitose (também chamada de citodiérese) ocorre também em razão da interação de actina e miosina, e o seu mecanismo está esquematizado no Capítulo 8.

▸ **Microvilos.** O polo apical das células epiteliais do revestimento intestinal (Figura 7.17) e dos túbulos contorcidos renais apresenta numerosos prolongamentos muito finos, chamados microvilos. O estudo desses microvilos por microscopia eletrônica e imunocitoquímica revelou a presença de actina, miosina e α-actinina, proteínas relacionadas com a contração, mas que, nos microvilos, têm principalmente um papel de sustentação, mantendo a forma alongada do microvilo. Os microvilos contêm no seu interior ao redor de 40 feixes de actina. Estes se prendem a espessamentos que ocorrem na extremidade dos microvilos (Figura 7.18) e que se ligam entre si e com a membrana plasmática por meio de várias proteínas (Figura 7.19).

▸ **Movimentos morfogenéticos.** São os movimentos que ocorrem nos tecidos durante o desenvolvimento embrionário. Sabe-se, por exemplo, que os esboços das glândulas salivares e do pâncreas formam-se graças a invaginações do epitélio oral e intestinal, respectivamente. Diversos estudos demonstraram a presença de filamentos de actina associados a moléculas de miosina, formando uma espécie de cintura em torno do polo apical das células prismáticas dos epitélios que se invaginam (Figura 7.20). O deslizamento desses filamentos de actina sobre os de miosina promove uma constrição do ápice das células, dando-lhes a forma de um cone truncado. Em consequência, a folha de células epiteliais tende a afundar no mesênquima subjacente. Essa invaginação do epitélio pode ser reproduzida *in vitro*, bastando transplantar para um meio de cultura o esboço glandular retirado do embrião em idade adequada. Adicionando-se ao meio de cultura citocalasina D, um inibidor da polimerização da actina G, observa-se que, ao mesmo tempo em que desaparecem os filamentos de actina, cessa a invaginação epitelial. Após a remoção da citocalasina D do meio, reaparecem os filamentos de actina e o sistema reassume o movimento de invaginação.

▸ **Movimento ameboide.** Esse tipo de movimento ocorre nas células livres como amebas, macrófagos, leucócitos e fibroblastos. O movimento ameboide se realiza por meio da extensão, pela célula, de um prolongamento da camada cortical ou cór-

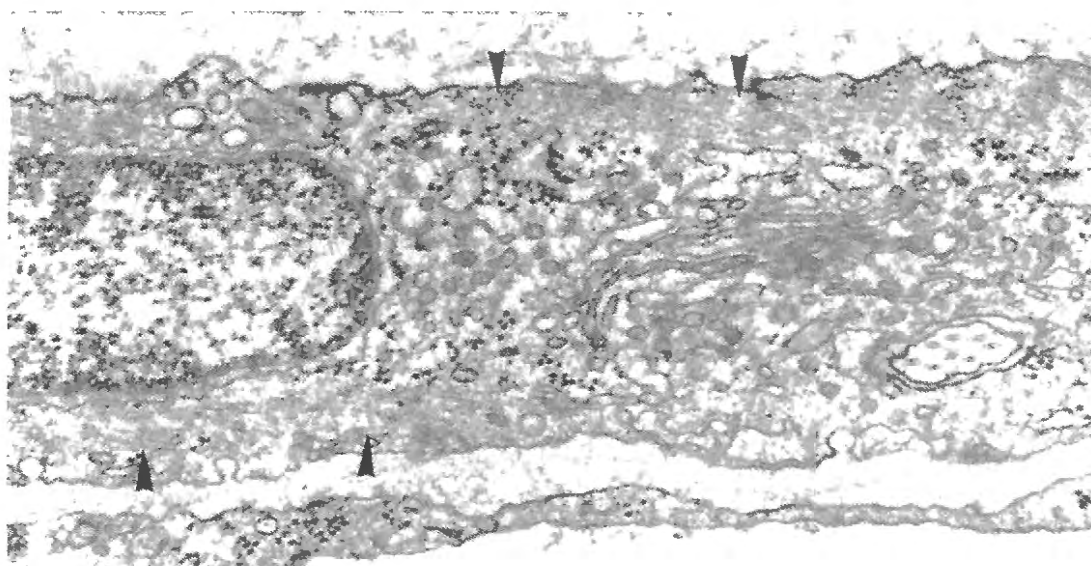



Figura 7.15 ▪ Eletromicrografia de célula mioide da parede de túbulo seminífero do testículo. Observe a abundância de filamentos finos (actina) intracitoplasmáticos (*cabeças de seta*). Aumento: 43.000×.

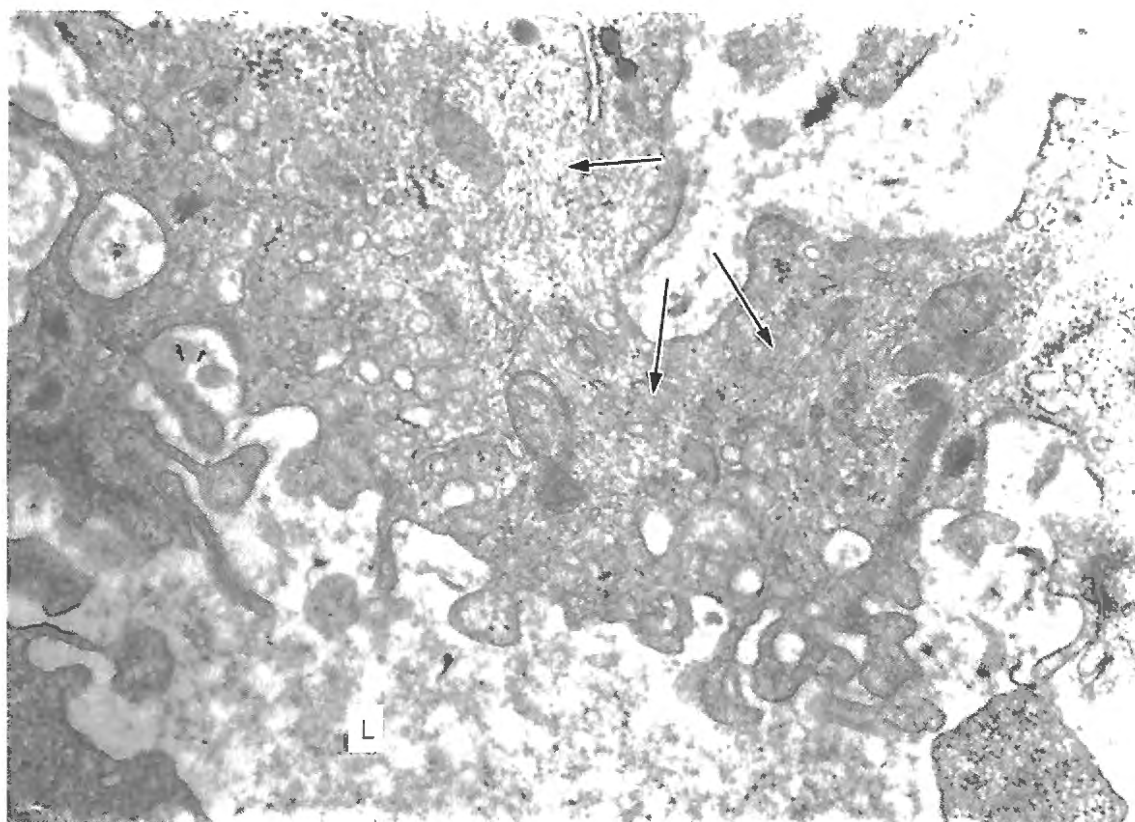



Figura 7.16 ▪ Eletromicrografia de corte de parede de vaso sanguíneo capilar humano. Notar a presença de feixes de filamentos de actina no citoplasma das células endoteliais (*setas*). Em L, a luz do vaso. Esses filamentos participam da contração que se observa nessas células. Aumento: 45.000×.

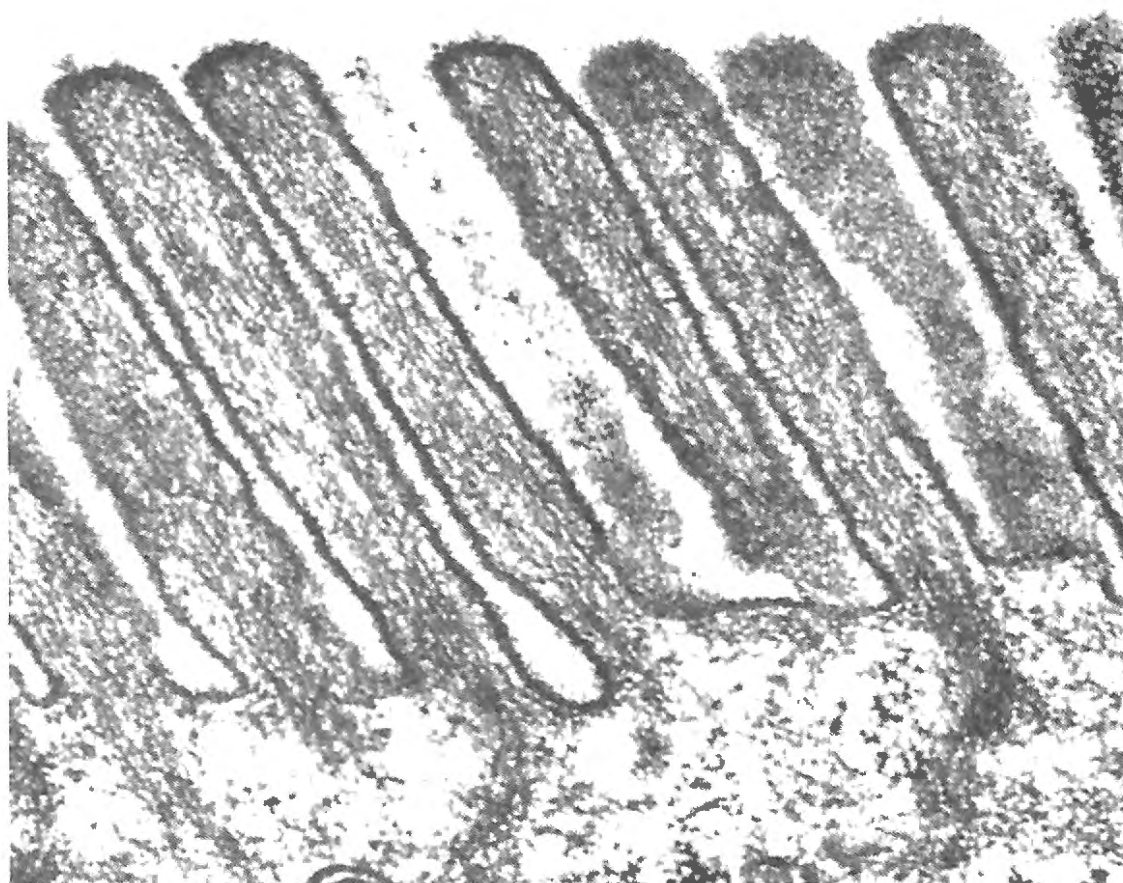



Figura 7.17 ▪ Micrografia eletrônica do polo apical de uma célula do intestino delgado. Observe a presença de feixes de filamentos dispostos paralelamente nos microvilos e, também, no citoplasma subjacente. Essa célula é especializada para a absorção de nutrientes, e os microvilos têm a função de aumentar a área absorvente. Aumento: 15.000×.

Actina

Zonula adherens com α-actinina

Miosina

Célula do epitélio intestinal

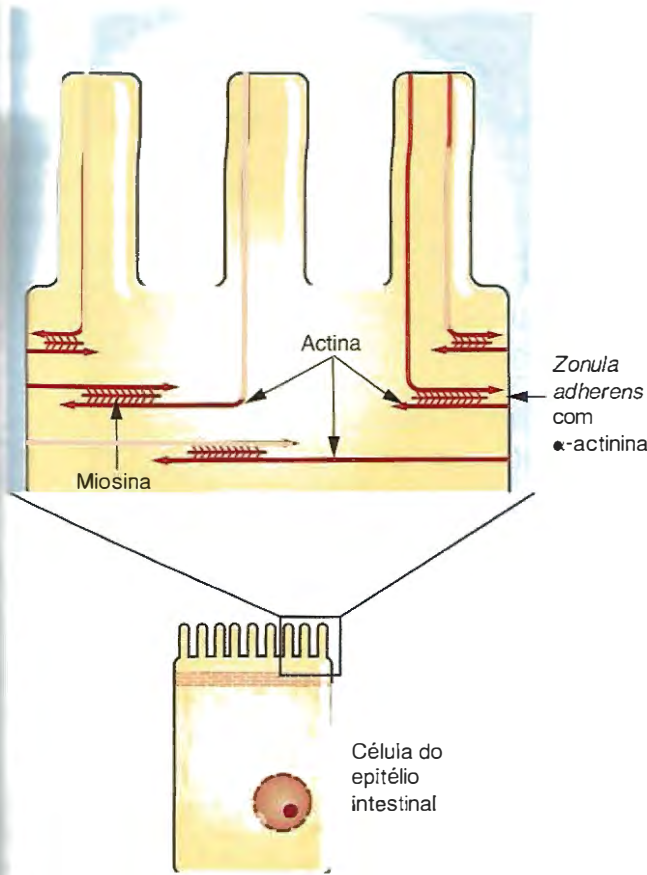



Figura 7.18 ▪ Ilustração do modelo que se admite para a região dos microvilos. Filamentos finos de actina se inserem na extremidade dos microvilos e lateralmente, na *zonula adherens*. Filamentos grossos de miosina formariam pontes com os filamentos de actina. Nesse local, essas proteínas, associadas a diversas outras, têm principalmente papel estrutural, mantendo a forma dos microvilos, como mostra em mais detalhes a Figura 7.19.

Figura 7.19 ▪ O desenho mostra o papel estrutural exercido pelos microfilamentos de actina e proteínas associadas, na manutenção da forma dos microvilos. Essas proteínas prendem os microfilamentos uns aos outros e à membrana plasmática. No ápice do microvilo existe um material proteico que fixa os microfilamentos, contribuindo para a estabilidade do conjunto.

tex do citoplasma, muito rica em actina. Esse prolongamento é denominado pseudópodo e, ao se fixar em um substrato, parece puxar o resto da célula em sua direção. Do movimento ameboide participam actina, miosina e outras proteínas, sendo a energia fornecida por ATP. A Figura 7.21 mostra, por imunofluorescência, a distribuição de feixes das proteínas actina e tropomiosina no citoplasma de fibroblastos, proteínas que participam da movimentação dessas células.

▪ Os movimentos dos cílios e flagelos são promovidos por microtúbulos

Os cílios são estruturas com aspecto de pequenos pelos com 0,25 μm de diâmetro constituídos por um feixe de microtúbulos dispostos paralelamente e envoltos por membrana (Figura 7.22).

Os cílios são curtos, múltiplos e, nos epitélios, situam-se sempre na superfície apical das células. Os flagelos são geralmente únicos e longos e, no corpo humano, encontrados apenas nos espermatozoides.

As células ciliares, presentes no organismo humano na árvore respiratória e no oviduto, encontram-se associadas a células que secretam muco e têm como função o transporte unidirecional de uma camada delgada de muco que reveste a superfície interna dessas estruturas tubulares. Dessa maneira, a poeira que atinge a árvore respiratória é captada pelo muco e transportada para a cavidade oral, enquanto, no oviduto, ocorre um fluxo de muco para o útero, o que facilita o transporte dos óvulos.

O movimento flagelar dos espermatozoides ocorre por um abalo tipo vaivém, que se inicia na base do flagelo, perto do núcleo do espermatozoide. A atividade do flagelo movimenta o espermatozoide para a frente. A Figura 7.23 ilustra como se processam o movimento ciliar e o movimento flagelar.

Tanto os cílios como os flagelos são feixes de microtúbulos, de regra formados por 9 pares de microtúbulos dispostos em círculo ao redor de um par central. Os microtúbulos dos pares periféricos apresentam-se fundidos uns aos outros, enquanto, no par central, encontram-se separados (Figura 7.24). Descrevem-se ainda, nos cílios e flagelos, pequenos braços que partem de um dos microtúbulos dos pares periféricos ligando-os ao par adjacente: são formados por uma proteína, a nexina (Figura 7.24). Além dessa estrutura, descrevem-se pequenas pontes que unem entre si os pares de microtúbulos periféricos. Sabe-se que os pequenos braços são constituídos por um complexo de vários polipeptídios atingindo um peso molecular de 400 kDa, com atividade ATPásica, chamado dineína. Uma série de experiências, realizadas com flagelos isolados de caudas de espermatozoides, demonstraram que os

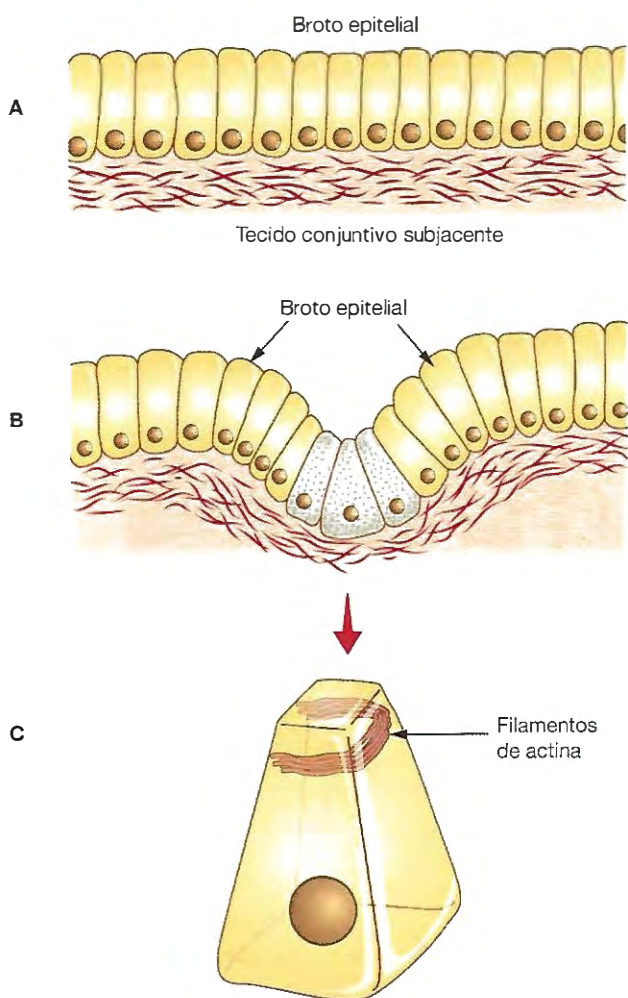



Figura 7.20 ▪ O desenho ilustra a invaginação do epitélio da cavidade oral (**A**) durante a fase inicial da morfogênese das glândulas salivares. As células centrais do broto epitelial (**B**) têm forma de pirâmide truncada em razão da constrição de seu ápice por um colar interno de microfilamentos (**C**). (Segundo estudos de Wessels, N. K. e cols.: *Science*, **171**:135, 1971.)

pares de microtúbulos deslizam entre si durante a contração e que a força motriz para esse movimento deriva da interação dos braços de dineína com os microtúbulos adjacentes.

Segundo esse modelo, a dineína estabelece contato com a tubulina de microtúbulos adjacentes e gera forças que promovem movimento de deslize entre pares de microtúbulos adjacentes, provocando o deslizamento de um par em relação ao outro. Esse deslizamento é limitado por proteínas que prendem os pares de microtúbulos uns aos outros. A resultante da ação dessas forças contidas leva a um dobramento dos cílios (Figura 7.25).

Na realidade, do ponto de vista da biologia molecular, o funcionamento dos microtúbulos é complexo, já que diversas proteínas se associam à tubulina. Tanto os cílios como os flagelos inserem-se em estruturas semelhantes aos centríolos, chamadas corpúsculos basais (Figura 7.26), que apresentam 9 agregados de 3 túbulos periféricos mas sem o par central. Frequentemente, os corpúsculos basais apresentam prolongamentos dotados de estriações transversais que se dirigem para dentro do citoplasma, formando as chamadas raízes dos cílios, que teriam a função de sustentar e ancorar os cílios na célula (Figura 7.26).

Os corpúsculos basais reproduzem-se (Figura 7.27) por mecanismos pouco conhecidos. Esse processo em geral inicia-se pela aglomeração de uma substância elétron-densa, o material pericentriolar, que pode ocorrer ao lado de centríolos preexistentes ou, então, livre no citoplasma, independentemente de centríolos.

Várias observações mostram que o ATP fornece energia para os movimentos ciliar e flagelar. Por exemplo, a queda do teor de ATP nos espermatozoides diminui sua motilidade; a adição de ATP a células ciliadas ou a flagelos isolados e previamente tratados por detergente (para remover a membrana e facilitar a entrada do ATP) promove vigorosos movimentos dos cílios e flagelos. Um exemplo extremo de acúmulo de

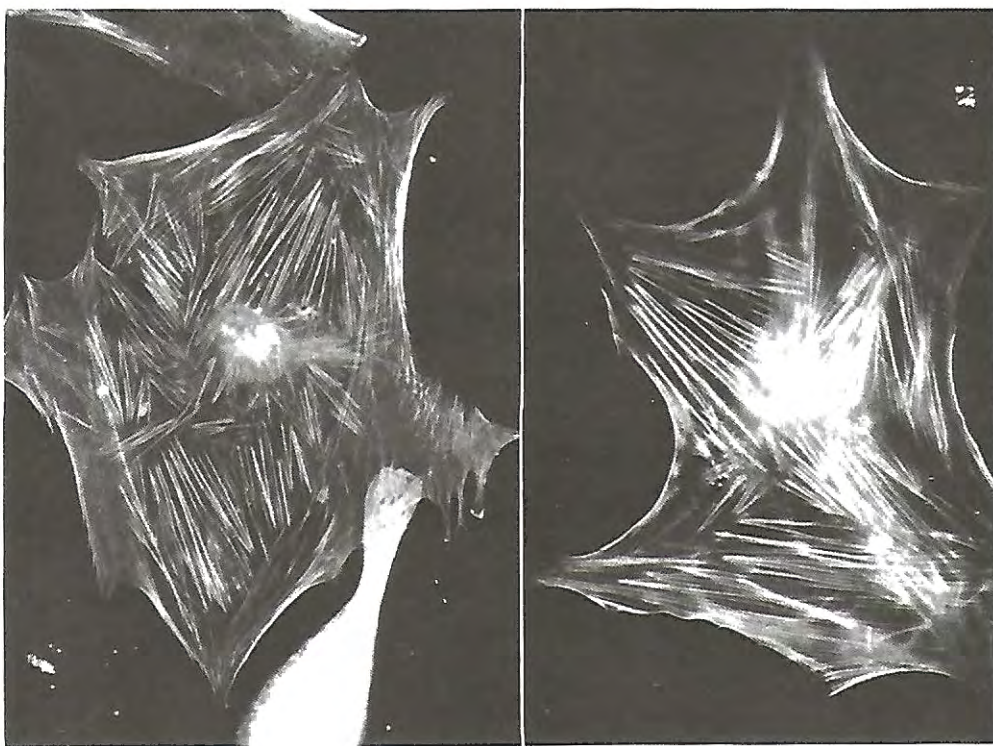



Figura 7.21 ▪ Fotomicrografia de imunofluorescência obtida com o emprego de anticorpos antiactina (*à esquerda*) e antitropomiosina (*à direita*). As figuras mostram a presença dessas proteínas em fibras intracitoplasmáticas de fibroblastos de pele humana. A tropomiosina é uma proteína que se encontra associada à actina nas células. (De Lazarides, E.: *J. Cell Biology*, **65**:549, 1975; reprodução autorizada.)

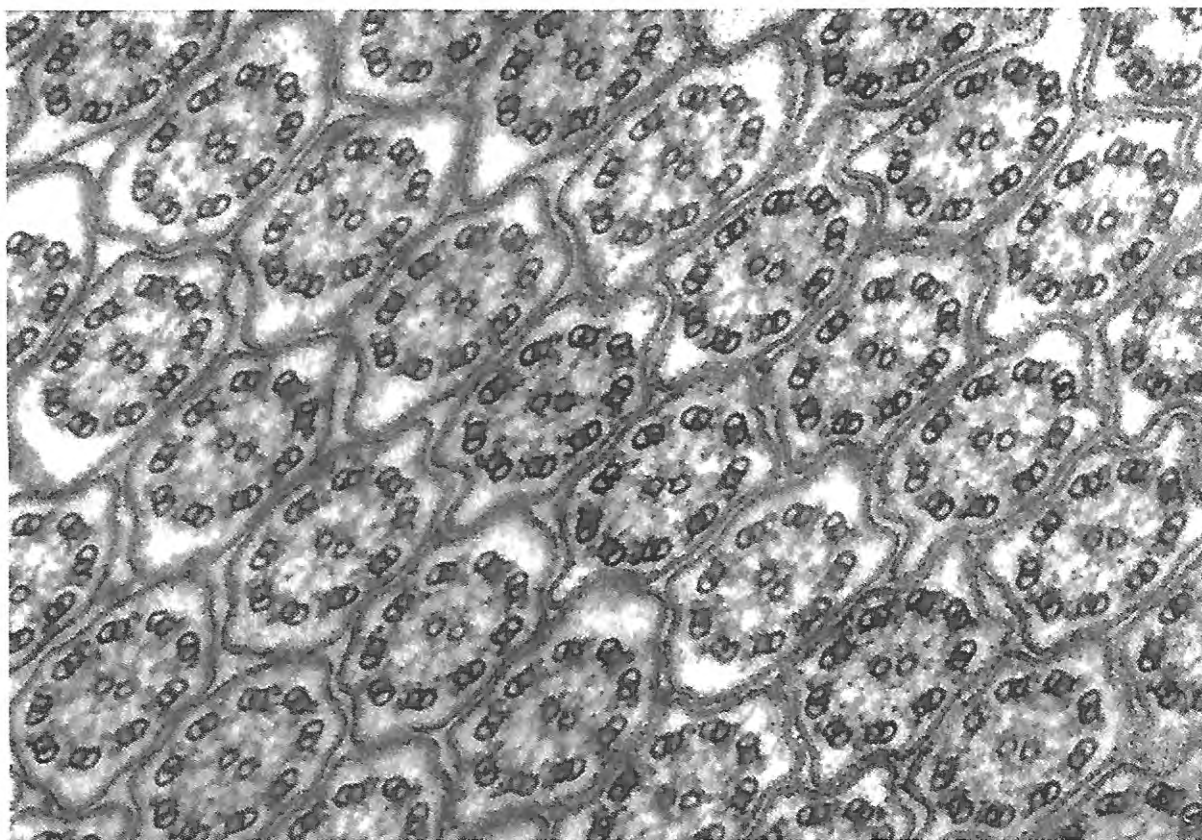



Figura 7.22 ▪ Eletromicrografia de corte transversal de cílios. Observe a membrana plasmática envolvente com a sua disposição de unidade de membrana. Dentro de cada cílio, 9 pares de microtúbulos fundidos e um par central não fundido. Aumento: 84.000×.

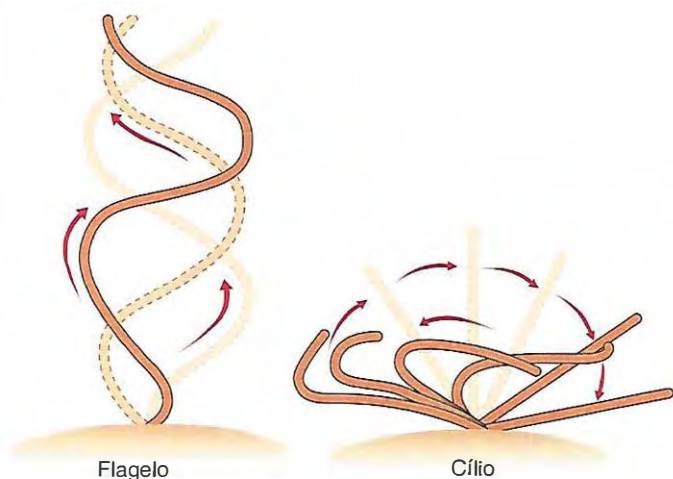



Figura 7.23 ▪ Os desenhos mostram o movimento dos flagelos e cílios. O flagelo se movimenta por uma contração que se inicia na base e se transmite ao longo do flagelo. Na parte ativa do movimento ciliar, que movimenta partículas ou a própria célula, o cílio permanece rígido (*esquerda para a direita*, no desenho). Em seguida, o cílio se torna flexível e retorna à posição inicial, para iniciar novo ciclo. Assim, nas células fixas, o batimento ciliar impulsiona partículas em uma direção determinada (*setas superiores*). Nas células livres, o batimento ciliar movimenta a célula.

Figura 7.24 ▪ O esquema ilustra a ultraestrutura do cílio e do flagelo, observada em corte transversal. Observe os 9 pares fundidos de túbulos periféricos, que se prendem entre si pelos braços de dineína e por ligações laterais (nexina). Os pares periféricos se ligam ao par central (não fundido) por meio dos filamentos radiais.

microtúbulos relacionados com movimento flagelar de espermatozoide é ilustrado na Figura 7.28. Nas células dos epitélios ciliados, as mitocôndrias dispõem-se principalmente no polo apical, em situação ideal para fornecerem aos cílios o ATP por elas produzido (Figura 7.26). Fenômeno análogo ocorre nos espermatozoides dos mamíferos, cujo flagelo é envolto por uma espiral de mitocôndrias na sua porção inicial.

Os cílios e flagelos são estruturas complexas constituídas por numerosas proteínas diferentes, várias das quais são imprescindíveis para sua movimentação.

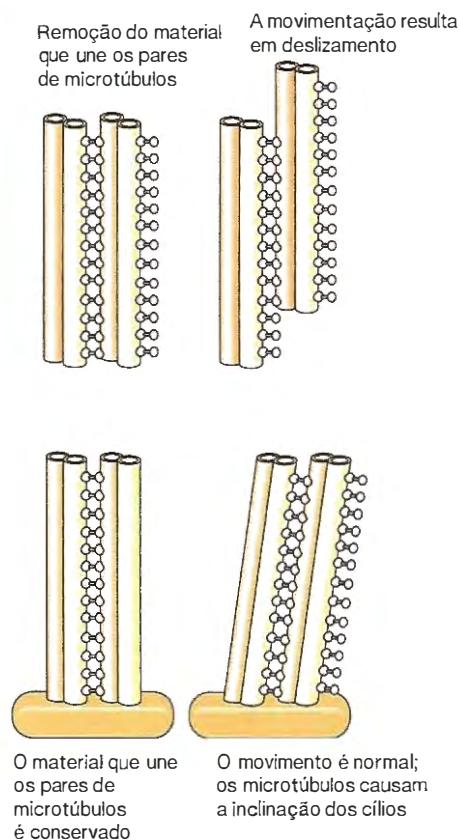



Figura 7.25 ▪ Modelo molecular simplificado para explicar os movimentos ciliar e flagelar. Resultados de experimentos realizados em condições normais e após a retirada do material (nexina) que une os microtúbulos dos flagelos dos espermatozoides. Os desenhos de cima mostram que a contração de microtúbulos que não estão fixados leva ao deslizamento de um sobre o outro. Os desenhos inferiores mostram que a fixação dos microtúbulos determina que o movimento seja de encurvamento, e não de deslizamento.

A síndrome de Kartagener, assim denominada em homenagem a seu descobridor, acarreta em seus portadores frequentes infecções respiratórias, sinusite crônica e esterilidade masculina. As mulheres portadoras da síndrome são férteis. Essa síndrome foi descrita na década de 1930, mas só recentemente suas bases moleculares foram descobertas. O estudo dos espermatozoides de pacientes com a síndrome de Kartagener mostrou que os braços de dineína estão ausentes nos cílios e flagelos, o que impede a movimentação dessas estruturas, impossibilitando o deslocamento dos espermatozoides e o batimento ciliar responsável pela eliminação contínua de poeiras que penetram na árvore respiratória. Recentemente foram descritas outras doenças de sintomatologia semelhante, causadas pela ausência de outras proteínas que também participam da movimentação dos cílios e flagelos, criando assim um complexo de enfermidades: a síndrome dos cílios imóveis.

Os microtúbulos e filamentos de actina servem de ponto de apoio para proteínas motoras

O estudo dos processos de deslocamento intracitoplasmático de partículas celulares foi facilitado graças à análise de células onde partículas são visíveis e ostensivamente transportadas dentro das células, como nos melanóforos (Figura 7.29), células que contêm grânulos de melanina. Esses deslocamentos intracitoplasmáticos também foram muito estudados nos prolongamentos dos neurônios ou células nervosas (Figura 7.30).

O estudo desses e de outros modelos levou à descoberta de que esse processo ocorre graças à participação de vários tipos de complexos proteicos específicos, chamados de proteínas motoras (Figura 7.31). Cada complexo de proteína motora é constituído por dois tipos de componentes: os componentes

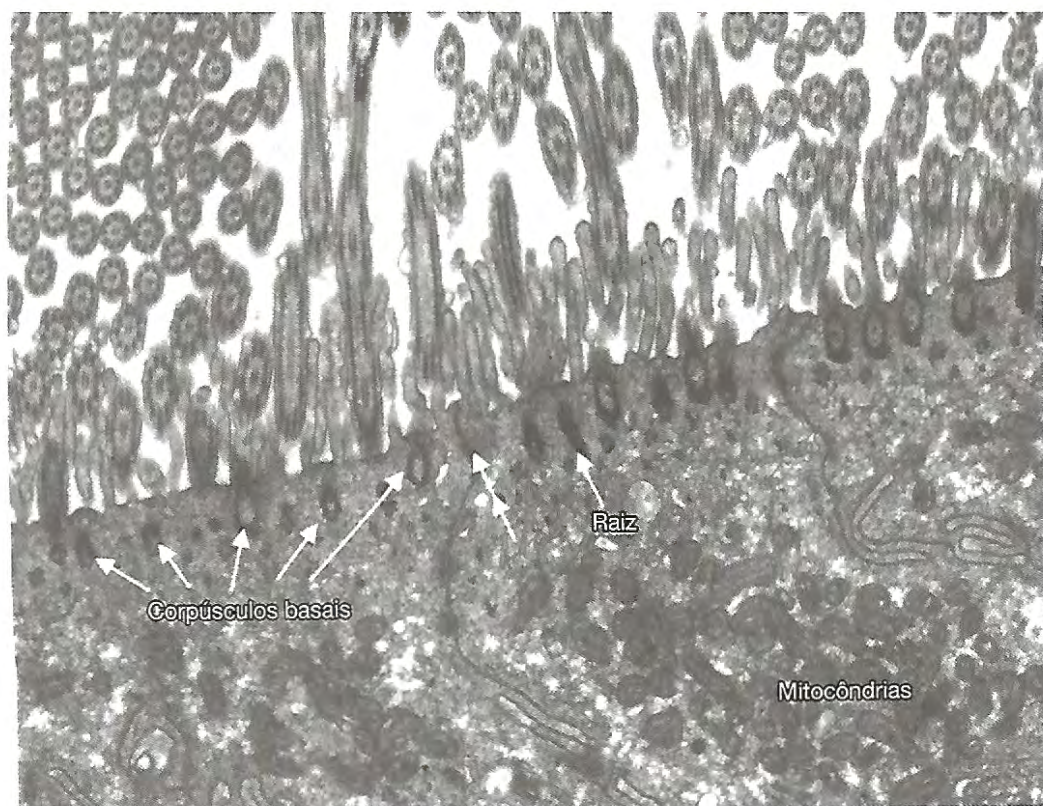



Figura 7.26 ▪ Eletromicrografia da região apical de células ciliadas. Observe os cílios implantados nos corpúsculos basais (*setas simples*), de onde partem as raízes dos cílios. Note-se o acúmulo de mitocôndrias, fornecedoras de energia (ATP) no ápice dessas células. Entre os cílios, observam-se microvilos na superfície das células. Na *seta dupla*, um complexo juncional. Aumento: 25.000×.

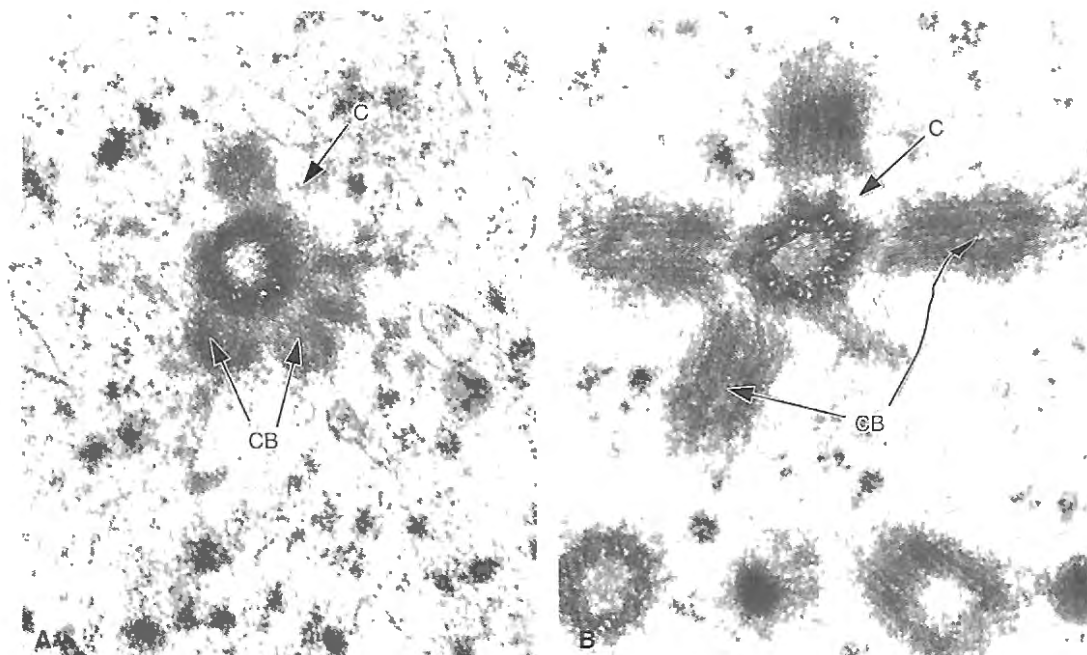



Figura 7.27 ▪ A eletromicrografia mostra a formação de corpúsculos basais no oviduto de macaca. Quando se injeta hormônio estrógeno em macacas, formam-se, em pouco tempo, muitos cílios na superfície das células epiteliais do oviduto. As figuras ilustram a formação de corpúsculos basais (CB) ao lado de um centríolo preexistente (C). Em **A**, fase inicial de formação e, em **B**, fase mais adiantada. Admite-se que a maior parte dos corpúsculos basais se forma sem a presença de centríolos preexistentes. (Cortesia de Anderson, R. G. W. and Brenner, R. M.: *J. Cell Biology*, **50**:10, 1971. Reprodução autorizada.)

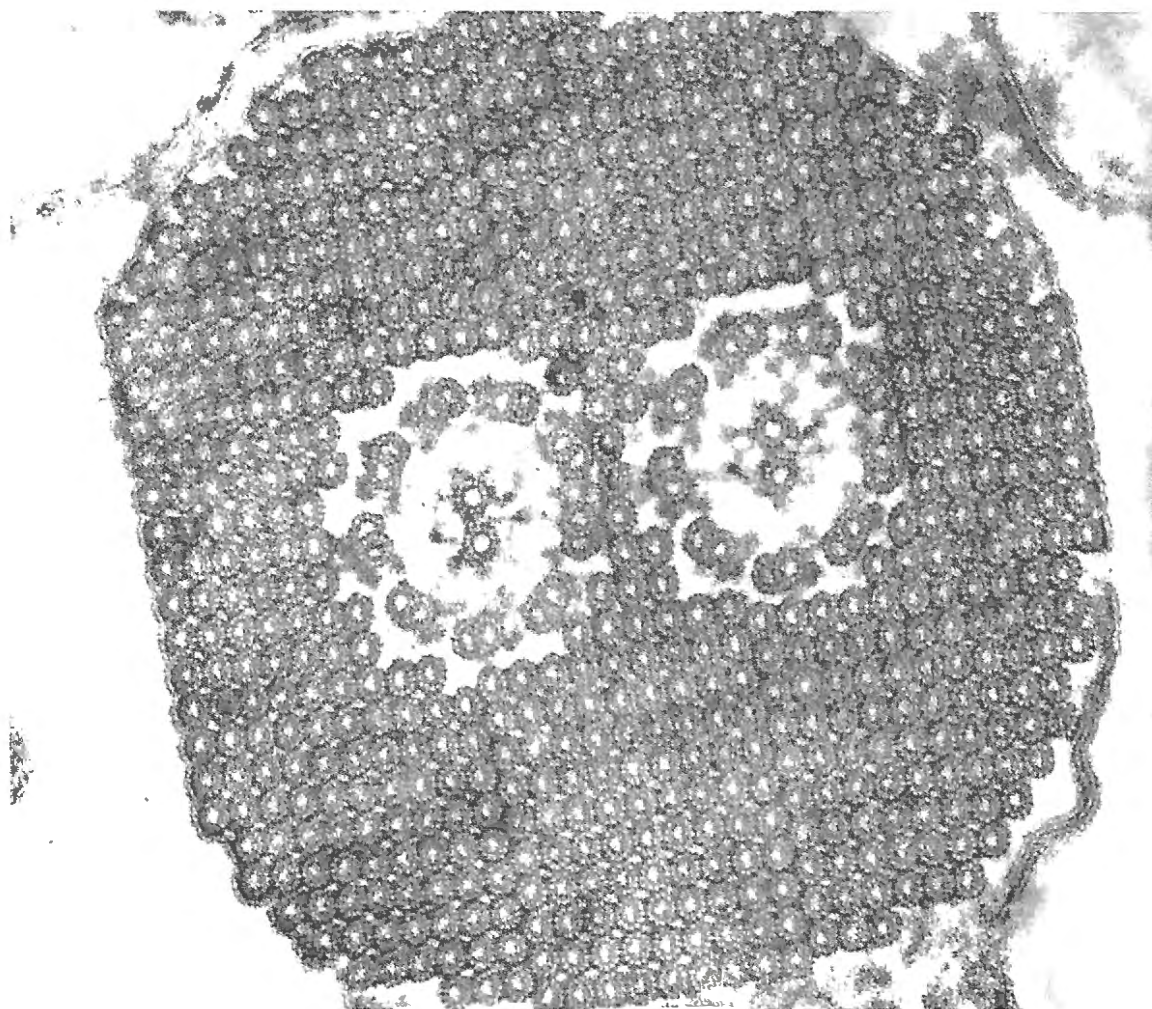



Figura 7.28 ▪ Corte transversal da cauda de espermatozoide do sapo *Racopholus scheligelii arborea* fixado na mistura glutaraldeído-ácido tânico, seguida de tratamento pelo ósmio (coloração negativa). Um par de estruturas semelhantes a flagelos é envolto por aproximadamente 500 microtúbulos. Cada microtúbulo é constituído por 13 subunidades globosas. (Cortesia de V. Mizuhira.)

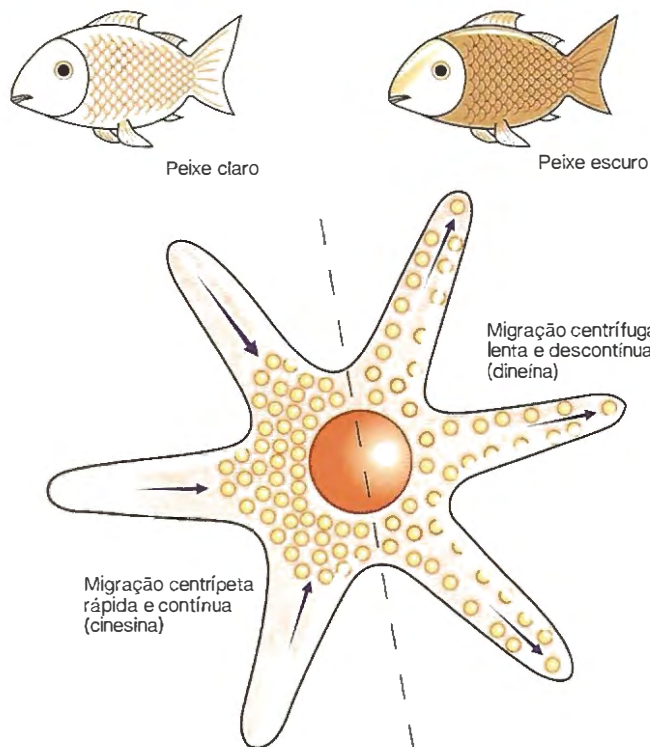



Figura 7.29 ▪ O desenho mostra transporte intracelular em um melanóforo, cujos grânulos de melanina se deslocam em direção centrípeta, por estímulo nervoso, ou centrífuga, quando cessa esse estímulo. Dessa maneira, os peixes se adaptam à cor ambiental, defendendo-se de seus predadores.

Figura 7.30 ▪ Ilustração da movimentação intracelular nos axônios (prolongamentos dos neurônios), que transportam partículas diversas com velocidades diferentes, nas duas direções.

adaptadores, que se prendem, de um lado, especificamente às várias partículas a serem transportadas e, do outro lado, aos segundos componentes, que são os componentes motores. Estes, por sua vez, se prendem, em uma extremidade, aos adaptadores e, na outra, aos microtúbulos ou aos filamentos de actina, promovendo o deslizamento do complexo proteína motora+partícula ao longo dos microtúbulos. Isso ocorre graças à energia derivada de ATP pela ATPase presente nos componentes motores.

Foram descritos dois tipos de componentes motores que promovem o deslocamento das partículas sobre os microtúbulos. Um desses componentes consiste nas proteínas da família das dineínas, que transportam partículas na direção da extremidade mais para a extremidade menos (+ para –). As proteínas da família das cinesinas promovem o deslocamento em direção oposta (– para +). Outra família de proteínas motoras é constituída pelas miosinas, que produzem movimento em asso-

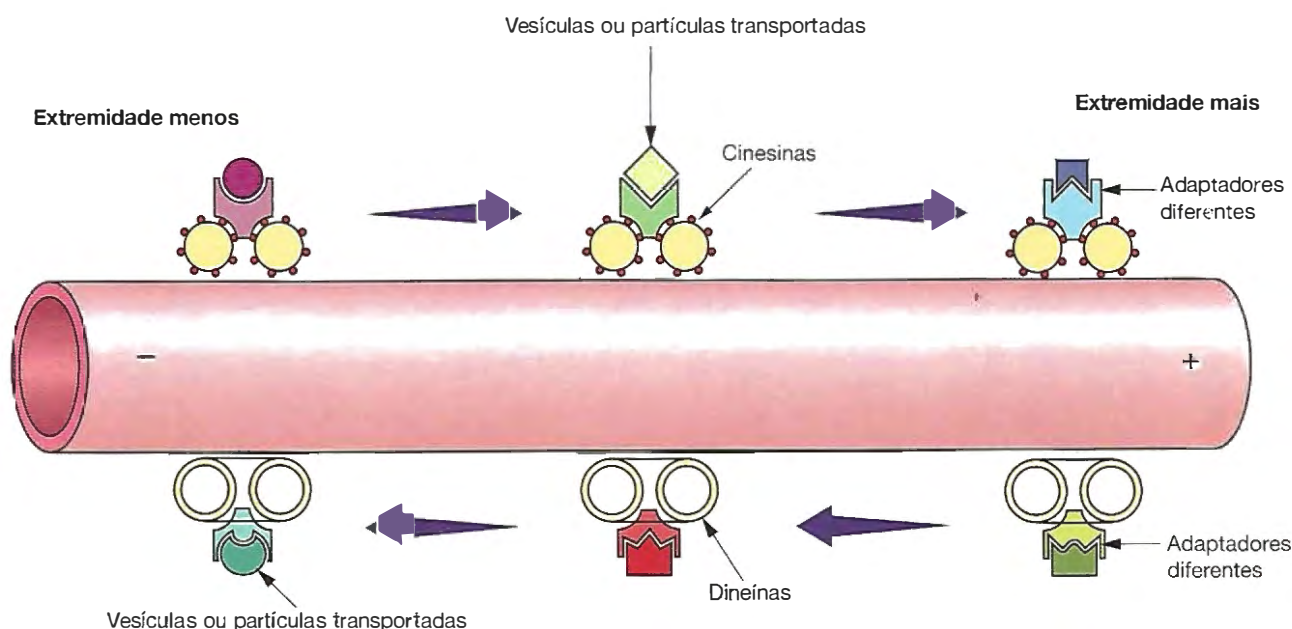



Figura 7.31 ▪ O desenho esquemático mostra a participação das proteínas motoras cinesina e dineína na movimentação de partículas citoplasmáticas ao longo de um microtúbulo. A cinesina transporta na direção da extremidade mais (+) e a dineína na direção da extremidade menos (–) do microtúbulo. A variedade de cinesinas, dineínas, proteínas motoras e proteínas adaptadoras possibilita o transporte de partículas e vesículas diversas de um local para outro no interior da célula.

ciação com os filamentos de actina. A direção e a velocidade do transporte intracelular de partículas dependem da diversidade das proteínas motoras existentes nos vários tipos de células.

As células pigmentares dos vertebrados inferiores, chamadas cromatóforos, são um modelo no qual o transporte intracelular é fácil de visualizar. Os cromatóforos que contêm pigmento negro (melanina) são grandes e de fácil observação. Chamam-se melanóforos e, em geral, têm forma estrelada. O controle do deslocamento intracelular dos grânulos de pigmento dos cromatóforos é feito, na maioria dos peixes, via sistema nervoso simpático pela liberação de norepinefrina nas terminações nervosas, o que promove a rápida migração centrípeta de pigmento. A migração do pigmento em direção oposta é um processo muito mais lento e irregular. A microscopia eletrônica revelou que os melanóforos contêm um par de centríolos, de onde se irradia grande quantidade de microtúbulos, entre os quais estão dispostos os grânulos de pigmento.

O tratamento prévio dessas células com colchicina ou vimblastina leva à despolimerização dos microtúbulos e, ao mesmo tempo, a um bloqueio da migração dos grânulos de pigmento. Esses resultados mostram que os microtúbulos têm papel relevante no transporte dos grânulos.

▶ **Extrusão de vesículas de secreção.** Em determinada fase do ciclo secretor, os grânulos ou vesículas de secreção são expulsos da célula por um processo de exocitose (*exo*, fora, e *cytos*, célula). Diversos trabalhos vêm demonstrando que os microtúbulos participam da extrusão dos produtos de secreção acumulados em vesículas no interior das células.

> A participação dos microtúbulos no processo da extrusão dos grânulos de secreção é ilustrada no diabetes genético do roedor *Acomys cahirinus*, que apresenta deficiência em microtúbulos. Nesses animais, as células produtoras de insulina (células B das ilhotas de Langerhans do pâncreas) sintetizam insulina normalmente, mas a carência de microtúbulos impede a eliminação dos grânulos de secreção, que se acumulam no citoplasma.

Resumo

Os filamentos de actina, os microtúbulos e as proteínas motoras miosina, dineína e cinesina são os principais componentes celulares que participam dos processos de movimentação. Algumas dessas estruturas do citoesqueleto são responsáveis também pela forma das células.

Os movimentos que acarretam modificações na forma das células (movimento ameboide, contração muscular, citocinese, contração das células mioides) resultam da interação de filamentos de actina com filamentos de miosina. Há, todavia, movimentos que se devem aos microtúbulos, como os movimentos ciliares e flagelares. A energia para os movimentos é obtida dos nutrientes, sendo daí transferida para ligações químicas na molécula de ATP, que é a fonte imediata de energia para os movimentos celulares.

Bibliografia

Bray, D. *et al.*: Cell motility. *Trends Cell Biol.*, 3:11, 1993.

Cole, N.B. and Lippincott-Schwartz, J.: Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:55, 1995.

Cooper, J.A. and Mitchison, T. (eds): Cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:1, 1995.

Fuchs, E. and Weber, K.: Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Ann. Rev. Biochem.*, 63:345, 1994.

Hyams, J. and Lloyd, C.W.: *Microtubules*. Wiley-Liss, 1994.

Janmey, P.A. and Chaponnier, C.: Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:11, 1995.

Junqueira, L.C.U.: O segredo da troca de cores nos animais. *Ciência Hoje*, **118**:6, 1996.

Kellog, D.R., Mortiz, M. and Alberts, B.M.: The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**:639, 1994.

Luna, A.J. and Hitt, A.L.: Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science*, **258**:955, 1992.

Mitchison, T. and Kirschner, M.: Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, **31**:237, 1984.

Moosekar, M.S.: Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **1**:209, 1985.

Palazzo, R.E.: The centrosome. *Science & Medicine*, **6**(2), 1999.

Satir, P.: How cilia move. *Science*, **231**:45, 1974.

Schnapp, B.J.: Molecular motors: Two heads are better than one. *Nature*, **373**:655, 1995.

Spudich, J.A.: How molecular motors work. *Nature*, **372**:515, 1994.

Traub, P.: *Intermediate Filaments*. Springer-Verlag, 1998.

Vallee, R.B. and Sheetz, M.P.: Targeting of motor proteins. *Science*, **271**:1539, 1996.

8 Núcleo da Célula

Celia Guadalupe T. J. Andrade
Berenice Quinzani Jordão

Roteiro

- O núcleo caracteriza a célula eucarionte
- Os componentes do núcleo são o envoltório nuclear, a cromatina, os nucléolos e o nucleoplasma
- O envoltório nuclear é constituído por duas membranas perfuradas por um número variável de poros que controlam o trânsito de moléculas.
- As proteínas nucleares são sintetizadas nos polirribossomos citoplasmáticos, porém com um sinal que marca sua destinação
- A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, constituído por DNA e proteínas histônicas
- As fibras cromatínicas presentes no núcleo interfásico têm 10 e 30 nm de diâmetro
- O nucléolo é o local de síntese do RNA ribossômico e de montagem das subunidades ribossômicas
- A matriz nuclear define os diferentes compartimentos nucleares
- O cromossomo metafásico é formado por um esqueleto de proteínas acídicas ao qual se associa a fibra cromatínica
- Os cromossomos gigantes são de dois tipos: politênicos e plumosos
- Os cromossomos plumosos são meióticos; os politênicos, interfásicos
- A engenharia genética ou tecnologia do DNA recombinante tem possibilitado o sequenciamento de genes específicos
- Um gene pode ser clonado, alterado e introduzido em um organismo estranho.

A existência do núcleo é a principal característica que distingue a célula eucarionte da procarionte. A maior parte da informação genética da célula está contida no DNA do núcleo, havendo apenas uma pequena porção fora dele, nas mitocôndrias e cloroplastos. Além disso, o núcleo controla o metabolismo celular pela transcrição do DNA nos diferentes tipos de RNA, que são traduzidos em proteínas, os efetores finais da informação genética.

O ciclo de vida da célula é dividido em duas fases principais: a mitose e a intérfase. Na mitose ocorre a divisão da célula, enquanto o período entre duas divisões constitui a intérfase. Assim, de acordo com a fase em que a célula se encontra, distinguem-se o núcleo interfásico (Figura 8.1) e o núcleo mitótico. Neste capítulo, serão abordados os aspectos estruturais e funcionais do núcleo interfásico, enquanto o núcleo mitótico será assunto do Capítulo 9.

A maioria das células apresenta um único núcleo, apesar de existirem células com dois ou mais núcleos. São exemplos algumas células hepáticas que são binucleadas e a fibra muscular estriada esquelética, que contém várias dezenas de núcleos.

O núcleo, geralmente, localiza-se no centro da célula. No entanto, em células que armazenam material a ser secretado, como as células acinosas do pâncreas e as caliciformes do intestino, o núcleo tem posição basal. Por outro lado, as células vegetais apresentam núcleo periférico em razão do grande vacúolo citoplasmático. Estudos recentes mostram que o núcleo ocupa uma posição fixa no citoplasma graças à sua associação com componentes do citoesqueleto, tais como filamentos de actina e filamentos intermediários (assunto discutido no Capítulo 7).

Figura 8.1 ▪ Esquema do núcleo interfásico. O envoltório nuclear é constituído por duas membranas, que delimitam o espaço perinuclear. Em algumas regiões, as duas membranas se fundem, formando os poros, que são preenchidos pelos complexos de poro. O envoltório nuclear tem continuidade com o retículo endoplasmático, e a membrana nuclear externa apresenta ribossomos ligados à sua face citoplasmática. Grumos de cromatina condensada (Cc) estão associados ao envoltório nuclear, enquanto porções de cromatina descondensada (Cd) estão dispersas no núcleo. No nucléolo, estão representadas as porções fibrilares (F) e granulares (G), bem como a cromatina associada.

Geralmente, o formato do núcleo acompanha o da célula. As células prismáticas têm núcleos alongados, enquanto as células poligonais ou esféricas apresentam núcleos esféricos. Há também muitos núcleos com forma irregular (Figura 8.2).

Geralmente é difícil perceber ao microscópio de luz a forma das células animais; assim, o formato do núcleo é usado para inferir a forma da célula. Alterações no formato da célula causam alterações no do núcleo, uma vez que este associa-se a filamentos de actina que, por sua vez, ligam-se a proteínas da membrana plasmática.

O tamanho do núcleo pode variar de acordo com o metabolismo e com o conteúdo em DNA da célula. Células com metabolismo intenso apresentam núcleos volumosos. Métodos bioquímicos permitiram detectar, nesses núcleos, maior quantidade de proteínas relacionadas com a transcrição do DNA. A quantidade de DNA também é fator determinante do tamanho do núcleo. Em geral, os núcleos das células dos urodelos apresentam alto conteúdo de DNA e estão entre os maiores que se conhecem nos vertebrados; os núcleos das aves, por sua vez, com baixo conteúdo de DNA, são, em geral, pequenos.

O núcleo interfásico é composto por envoltório nuclear, cromatina, nucléolos e nucleoplasma (Figura 8.1).

O envoltório nuclear protege o material genético

O envoltório nuclear separa o núcleo do citoplasma, sendo responsável pela manutenção do núcleo como um compartimento distinto e permitindo que a célula controle o acesso ao seu material genético. Ele é visível apenas ao microscópio eletrônico, pois a espessura de suas membranas está abaixo do poder de resolução do microscópio de luz.

O envoltório nuclear é constituído por duas unidades de membrana concêntricas, que limitam uma cavidade interna, o espaço perinuclear, que tem espessura de 30 a 50 nm (Figuras 8.1 e 8.3) e contém proteínas solúveis. À face nucleoplasmática da membrana interna associa-se uma rede de filamentos que constitui a lâmina nuclear. A membrana externa contém ribossomos aderidos à sua superfície citoplasmática e apresenta continuidade com o retículo endoplasmático rugoso (Figuras 8.1 e 8.3), razão pela qual é considerada uma porção especializada do retículo.

As membranas do envoltório são lipoproteicas, contendo em torno de 30% de lipídios e 70% de proteínas, dentre as quais algumas são glicoproteínas. Cerca de 90% dos lipídios são fosfolipídios e os 10% restantes são triglicerídios, colesterol e ésteres de colesterol. A maioria das proteínas da membrana externa é comum às membranas do retículo. Algumas, no entanto, são específicas, tais como aquelas da família das nesprinas, que interagem com componentes do citoesqueleto e são responsáveis pela ancoragem e pelo posicionamento do núcleo na célula. A membrana interna apresenta uma composição própria de proteínas intrínsecas e periféricas, várias delas já caracterizadas. Algumas estabelecem ligações com proteínas da membrana externa, mas a maioria está envolvida com

Figura 8.2 ▪ Eletromicrografia de medula óssea na qual se observam células com núcleos de formas irregulares. **1.** núcleo em forma de S; **2.** em forma de U; **3.** dois núcleos arredondados; **4.** núcleo alongado; **5.** núcleos com cromatina descondensada; **6.** núcleos com cromatina condensada. 4.000×.

Figura 8.3 ▪ Eletromicrografia de uma região da célula, que mostra o envoltório nuclear constituído por duas unidades de membrana separadas pelo espaço perinuclear. As setas apontam a continuidade da membrana externa do envoltório nuclear com o retículo endoplasmático. **N.** Núcleo. 28.500×. (Cortesia de E.C. Farias.)

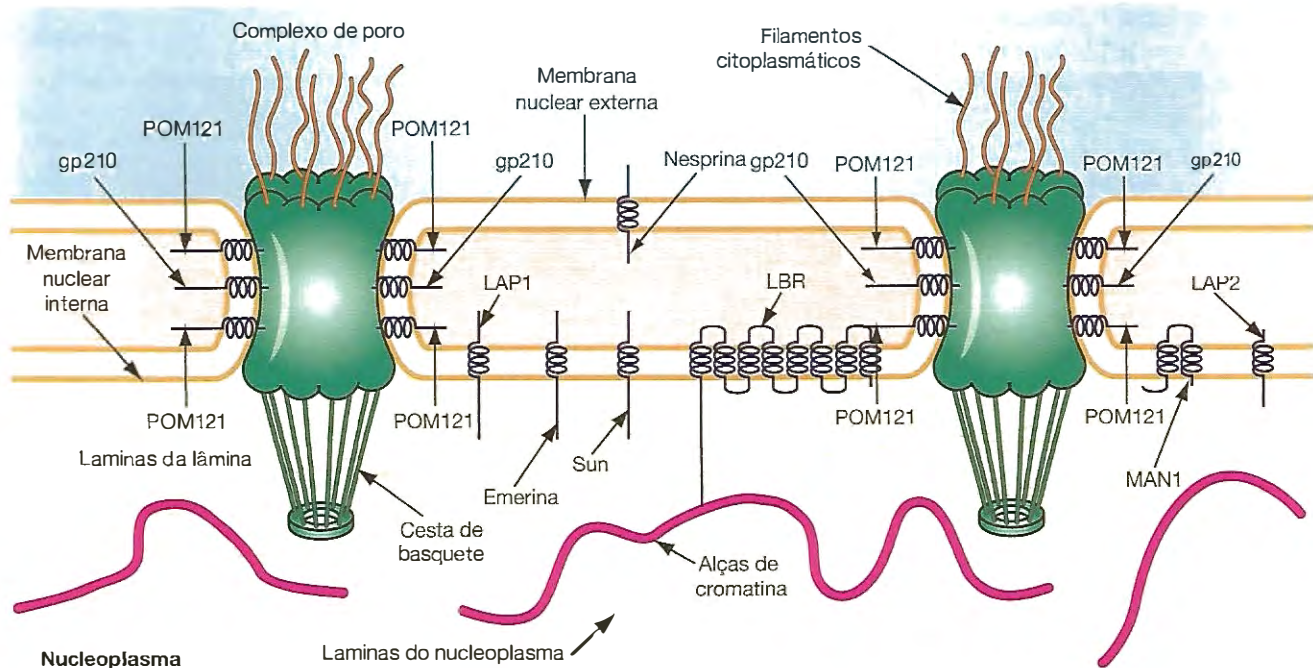



Figura 8.4 ▪ Representação esquemática do envoltório nuclear que mostra as interações das laminas com as proteínas intrínsecas da membrana nuclear interna e com os complexos de poro. As laminas associadas às proteínas intrínsecas e às Nup (que constituem a "cesta de basquete" do complexo de poro) constituem a lâmina nuclear, enquanto as laminas do nucleoplasma fazem parte da matriz nuclear. Fibras cromatínicas se associam ao envoltório nuclear por meio das laminas. Os complexos de poro são ancorados na membrana interna pelas proteínas gp210 e POM121. As proteínas transmembranosas LAP1, LAP2, Sun e emerina atravessam uma única vez a bicamada, enquanto a LBR é do tipo multipasso. A nesprina é uma proteína unipasso, intrínseca à membrana externa.

a interação da membrana interna à lâmina nuclear e à cromatina. São proteínas intrínsecas a emerina, o receptor para filamentos da lâmina (LBR – do inglês *lamina B receptor*), as LAP1 e 2 (do inglês *lamina-associated polypeptides*), a MAN1 e as Sun1 e 2 (Figura 8.4).

As proteínas dessas membranas são sintetizadas pelos polirribossomos aderidos à membrana externa do envoltório, ou seja, em continuidade com o RER. Elas são inseridas na bicamada lipídica e se difundem no plano da membrana, localizando-se na membrana interna, na qual são mantidas graças à sua associação com a lâmina nuclear e/ou com a cromatina.

▪ O envoltório nuclear é perfurado pelos complexos de poros

O envoltório nuclear não é contínuo como as demais membranas biológicas. Em alguns pontos, a membrana externa funde-se com a interna, formando os poros nucleares (Figuras 8.4 e 8.5). Esses poros são parcialmente preenchidos por agregados proteicos, os complexos de poro, que permitem e regulam o trânsito de macromoléculas entre o núcleo e o citoplasma (Figuras 8.4 e 8.6). Os poros são uniformemente espaçados, e sua quantidade por unidade de área do envoltório varia com o tipo de célula e com seu estágio funcional (Figura 8.5). Células com alta atividade de síntese proteica, como as células embrionárias, apresentam maior quantidade de complexos de poro por unidade de área da superfície do envoltório. Por outro lado, células com baixa atividade metabólica, como os eritrócitos nucleados, têm quantidade de complexos de poro significativamente menor.

Análises detalhadas, que incluem estudos ao microscópio eletrônico, tomografia ultraestrutural, proteômica e reconstituição por computador, permitiram a construção de modelos tridimensionais dos complexos de poro (Figura 8.7). Eles são constituídos por dois anéis proteicos que têm um arranjo octogonal e estabelecem o perímetro do poro. Um deles está ligado à superfície nuclear – anel nuclear –, e o outro à superfície citoplasmática do envoltório – anel citoplasmático. A disposição octogonal desses dois anéis leva ao estabelecimento de um canal central que é em parte preenchido por filamentos proteicos que se projetam como raios e se emaranham no interior do canal. Ainda, oito filamentos proteicos se projetam dos anéis citoplasmático e nuclear, constituindo uma estrutura semelhante a uma cesta de basquete, apenas no lado nuclear. O complexo de poro é ancorado na bicamada lipídica, nos pontos em que as membranas estão fundidas por dois tipos de proteínas intrínsecas, a POM121 (do inglês *pore membrane*) e a gp210 (do inglês *glycoprotein*) (Figura 8.4).

Estima-se que os complexos de poro sejam constituídos por mais de 100 moléculas proteicas, coletivamente denominadas nucleoporinas (Nup). Cada complexo contém cerca de 30 tipos diferentes de nucleoporinas, a maioria delas já caracterizada bioquimicamente, tais como a Nup153, Nup62, Nup54, Nup50, Nup35, entre outras (os números referem-se aos pesos moleculares dessas proteínas).

As Nup têm localizações específicas no complexo, algumas são simetricamente distribuídas, outras residem exclusivamente na face citoplasmática, outras na nucleoplasmática, e outras, ainda, estabelecem o perímetro do canal central (Figura 8.7). Duas classes de Nup foram identificadas: (1) as que apresentam sequências dos aminoácidos fenilalanina e

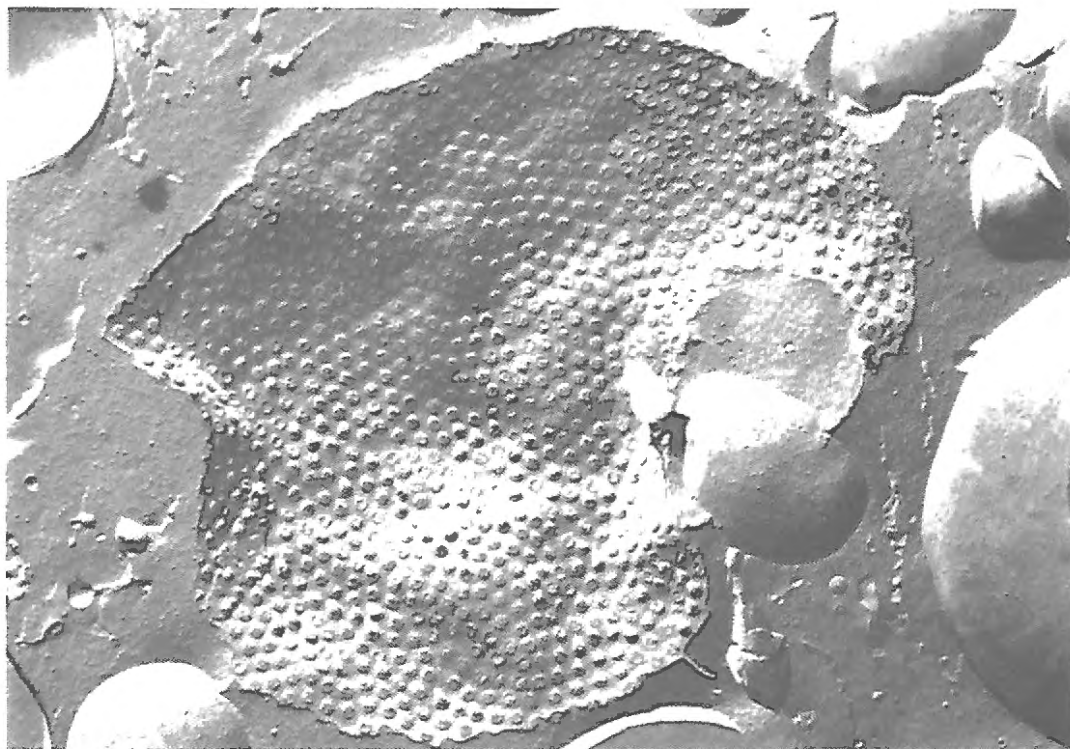



Figura 8.5 ▪ Envoltório nuclear da ameba *Entamoeba histolytica*, obtido pelo método de criofratura, que mostra o grande número de poros nucleares. 20.000 ×. (Cortesia de A. Martinez-Palomo.)

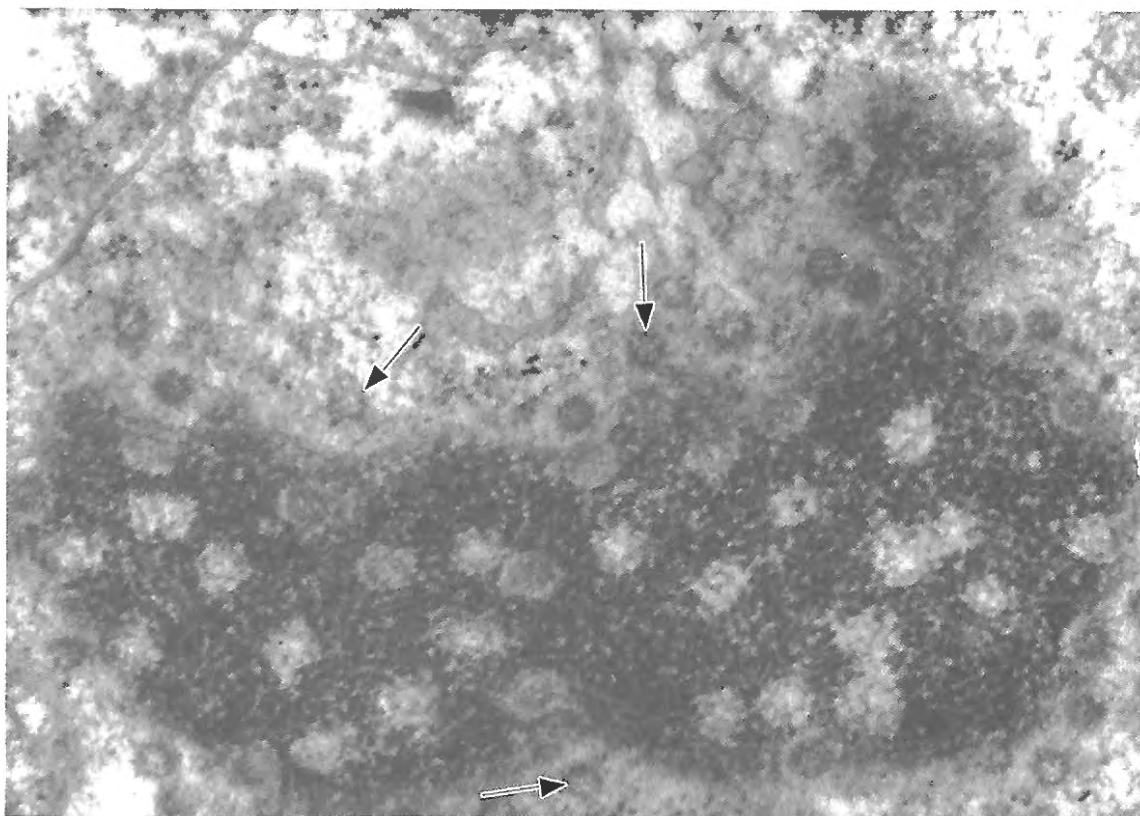



Figura 8.6 ▪ Eletromicrografia de corte oblíquo de calota nuclear de célula renal. *Embaixo*, a cromatina condensada, que se interrompe nas regiões correspondentes aos poros nucleares. Em alguns poros é visível uma estrutura elétron-densa, em um arranjo em anel (*setas*), que constitui os complexos de poro. 45.000×.

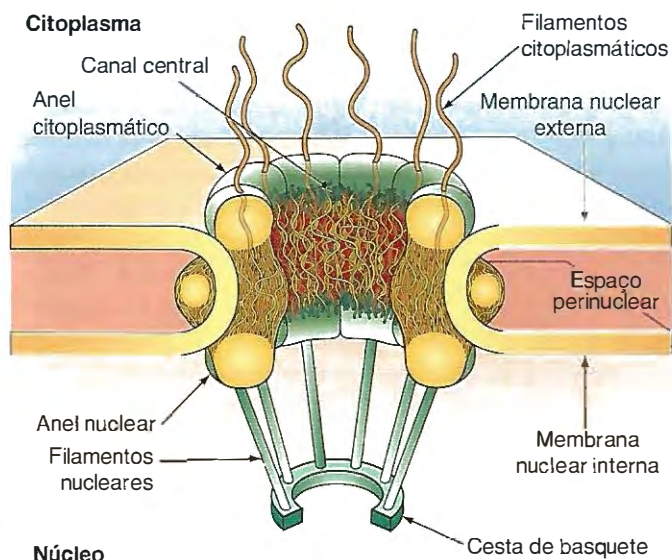



Figura 8.7 ▪ Esquema de corte do complexo de poro, formado por dois anéis proteicos que se dispõem em um arranjo octogonal. Do anel citoplasmático partem oito filamentos que mergulham no citosol, enquanto os filamentos que partem do anel nuclear formam uma estrutura semelhante a uma cesta de basquete no interior do núcleo. Ambos os anéis estão ancorados na bicamada lipídica, nos pontos em que as membranas se fundem. Essa disposição espacial dos anéis proteicos delimita um canal central, que é preenchido por filamentos das nucleoporinas e que participam do transporte de moléculas.

glicina (FG) que se repetem e se intercalam entre sequências de aminoácidos polares de comprimentos variados e estão envolvidas no transporte entre o núcleo e o citoplasma, e (2) aquelas que não apresentam domínios FG e fazem parte da estrutura dos complexos de poro. As sequências FG das Nup ficam expostas nos filamentos nucleares, nos citoplasmáticos e em todo o perímetro do canal central, no qual elas participam do transporte de moléculas.

Os complexos de poro têm um diâmetro externo de 120 nm e um peso molecular de 125 MDa (megadálton = 10^6 dáltons). O canal central, por sua vez, tem um diâmetro de 25 a 30 nm. A disposição dos filamentos das Nup no interior do canal central fecha parcialmente a abertura do complexo de poro (Figura 8.7).

O trânsito de moléculas através dos complexos de poro pode ocorrer tanto por transporte passivo quanto por ativo. Água, íons e pequenas moléculas de até 9 nm de diâmetro atravessam rapidamente o complexo de poro nos dois sentidos. Elas se difundem passivamente pelo canal central. A maioria das proteínas e RNA, no entanto, são grandes demais para se difundirem por esses canais. Essas macromoléculas atravessam os complexos de poro por um processo que consome energia, em que tanto as proteínas quanto os RNA são reconhecidos e transportados seletivamente. Normalmente, o núcleo importa do citoplasma proteínas de peso molecular elevado, como as polimerases do DNA (100.000 dáltons) e do RNA (200.000 dáltons). As proteínas próprias do núcleo são sintetizadas no citoplasma com sinais de localização nuclear, que consistem em uma ou duas sequências curtas de aminoácidos, ricas em lisina e arginina. As proteínas marcadas para destino nuclear atravessam os complexos de poro por um mecanismo que consome energia fornecida pelo GTP. Os sinais de destinação nuclear são reconhecidos pelos receptores de importação, que são proteínas citoplasmáticas da família das importinas (Figura 8.8). Estima-se que existam, em vertebrados, cerca de 20 tipos diferentes de importinas. A importina se liga à proteína a ser transportada, formando um complexo que, para ser translocado através do poro, deve interagir com as nucleoporinas. A importina do complexo importina-proteína nuclear é reconhecida pelas sequências FG das Nup, que compõem os filamentos citoplasmáticos, e pelas sequências FG das Nup, que formam o canal central do complexo de poro. Essas sequências funcionam como trilhos que promovem a translocação do complexo importina-proteína pelo poro. Após o transporte, a importina se desliga da proteína e retorna ao citoplasma, no qual pode ser utilizada em novo processo de importação. O sinal de localização nuclear não é removido depois que a proteína entra no núcleo, o que permite a reintrodução da proteína quando o envoltório nuclear se refaz após a mitose.

A exportação de RNA do núcleo para o citoplasma é semelhante à importação de proteínas, mas atua em direção oposta. Esse processo também é mediado por receptores de exportação específicos, ou seja, uma família de proteínas denominadas exportinas (Figura 8.8). O processo é ativo, consumindo energia fornecida pelo GTP. Os RNA transcritos no núcleo que desempenham sua função no citoplasma, ou seja, o mRNA, tRNA e rRNA, são exportados como complexos RNA-proteínas (RNP), e os sinais de exportação nuclear desses complexos RNP estão presentes nas proteínas. A única exceção encontrada foi a molécula de tRNA, uma vez que foi isolado e caracterizado um tipo de exportina que reconhece e se liga diretamente a ele. As moléculas de mRNA, por sua vez, estão complexadas com cerca de 20 proteínas, formando as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas ou hnRNP. Uma dessas proteínas, ao menos, deve conter um sinal de exportação nuclear, que é reconhecido e ligado a uma exportina, formando o complexo de exportação. Durante o processo de translocação através do complexo de poro, a exportina é reconhecida pelas sequências FG presentes nas Nup que constituem os filamentos nucleares e o canal central do complexo de poro e atuam como trilhos no transporte do complexo exportina-mRNA para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, a exportina libera sua carga e retorna ao núcleo, onde pode ser reutilizada em outro processo de exportação. Como será visto mais adiante, também os rRNA são exportados do núcleo na forma de partículas complexadas com proteínas, ou seja, na forma de subunidades ribossômicas.

A Ran controla o sentido da translocação de moléculas pelos poros

A direção do transporte de moléculas entre o núcleo e o citoplasma é regulada pela Ran (do inglês *RAs-related nuclear protein*), uma proteína de baixo peso molecular pertencente à família das enzimas que quebram GTP ou GTPases. Os receptores de importação nuclear (importinas) e de exportação (exportinas) contam com dois domínios: um que se liga à Ran e outro que se liga à molécula a ser transportada (Figura 8.8). A Ran hidrolisa o GTP, fornecendo energia para a translocação das moléculas por meio dos complexos de

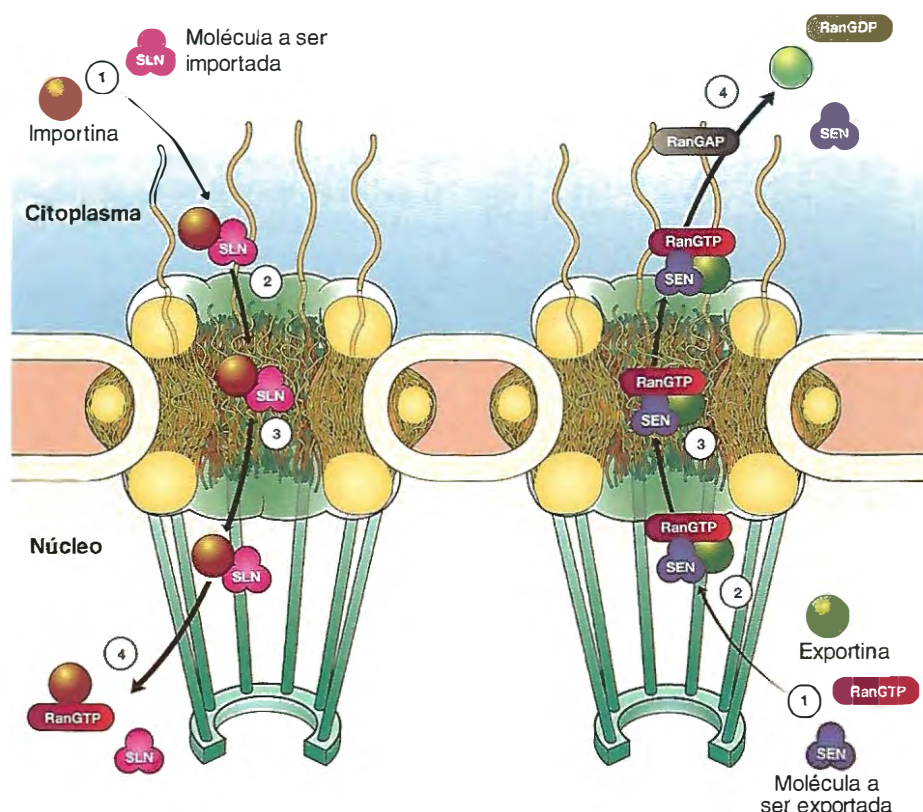



Figura 8.8 ▪ Representações esquemáticas do transporte de moléculas através dos complexos de poro. *À esquerda*, está representado o processo de importação de moléculas pelo núcleo. Nesse processo, a molécula a ser importada contém um sinal de localização nuclear (SLN) que é reconhecido pela importina e se liga a ela. O complexo importina-molécula importada liga-se às sequências FG das Nup (**1**), que funcionam como trilhos e fazem a translocação do complexo através do canal central do poro (**2** e **3**). No interior do núcleo (**4**), a RanGTP liga-se à importina, fazendo com que ela libere a molécula importada no nucleoplasma. *À direita*, o processo de exportação se inicia quando a molécula a ser exportada, contendo um sinal de exportação nuclear (SEN), é reconhecida pela exportina, liga-se a ela e à RanGTP (**1**). Esse complexo é reconhecido pelas sequências FG das Nup (**2**) e é translocado através do canal central do poro (**3**). Já no citoplasma, a Ran, ativada pela RanGAP, hidrolisa o GTP, assumindo a configuração RanGDP. A molécula exportada e a exportina são liberadas no citoplasma (**4**).

poro. A Ran pode adotar dois estados conformacionais diferentes, dependendo da sua ligação à molécula de GTP ou de GDP, sendo a RanGTP concentrada no núcleo e a RanGDP, no citoplasma.

O processo de importação inicia-se no citoplasma, quando a proteína que contém o sinal de importação nuclear liga-se à importina. O complexo proteína-importina atravessa o complexo de poro, como visto anteriormente, e, então, no núcleo, a RanGTP liga-se à importina, promovendo uma alteração conformacional no sítio de ligação da importina e causando a liberação da proteína no nucleoplasma. O complexo importina-RanGTP retorna ao citoplasma, no qual outra proteína, chamada GAP (do inglês *GTPase-activating protein*) ou proteína ativadora de GTPase, induz a atividade hidrolítica da Ran, que quebra o GTP, adotando a configuração RanGDP e liberando a importina no hialoplasma.

Na exportação, que se inicia no núcleo, a exportina liga-se, ao mesmo tempo, à proteína que contém o sinal de exportação nuclear e à RanGTP (Figura 8.8). Esse complexo é translocado através do complexo de poro, e, uma vez no citoplasma, a Ran, ativada pela GAP, hidrolisa o GTP, assumindo a configuração RanGDP, liberando a proteína e a exportina no citoplasma. A exportina retorna ao núcleo, no qual irá participar de um novo processo de exportação.

A lâmina nuclear confere forma e estabilidade ao envoltório nuclear

Associada à superfície interna do envoltório nuclear, encontra-se a lâmina nuclear, uma rede proteica com 20 a 50 nm de espessura (Figuras 8.1 e 8.4), que se interrompe nos poros nucleares. A lâmina é constituída pelas proteínas laminas que pertencem a uma classe de filamentos intermediários nucleares. Nos vertebrados, há três genes que codificam sete tipos de laminas: duas do tipo A (A e AΔ10) (Δ – do grego, delta); duas do tipo C (C e C2) e três do tipo B (B1, B2 e B3). As laminas dos tipos A e C são codificadas por um único gene, cujo RNA sofre diferentes modos de processamento (*splicing* alternativo), originando as quatro laminas. Os três tipos de laminas B, por sua vez, são codificados por dois genes, sendo que um deles, também por processamento diferencial, origina as laminas B1 e B2. Todas as células de vertebrados expressam pelo menos uma lamina do tipo B, enquanto as laminas do tipo A e C são expressas em células diferenciadas. Sugere-se que as laminas apresentem funções célula e tecido-específicas.

Cada molécula de lamina é um dímero de subunidades proteicas que se associam através das porções em α-hélice de cada cadeia polipeptídica e tem duas porções não helicoidais nas extremidades de cada cadeia. As extremidades não heli-

coidais, carboxi e aminoterminal, variam entre os diferentes tipos de laminas e estabelecem associações cabeça-cauda formando os protofilamentos. Os protofilamentos, por sua vez, associam-se lateralmente, formando filamentos muito parecidos com os filamentos intermediários do citoesqueleto, razão pela qual são classificados como tal.

As laminas associam-se ao envoltório nuclear por meio de proteínas intrínsecas à membrana nuclear interna, tais como as LAP 1 e 2, a emerina e a LBR (Figura 8.4). Elas se associam também aos complexos de poro, provavelmente por meio das nucleoporinas.

Durante a mitose, a fosforilação temporária das laminas causa a desorganização da lâmina nuclear. Ao final da mitose, as laminas são desfosforiladas e se associam novamente para refazer a lâmina, levando à reconstituição do envoltório nuclear.

Além de manter a forma e garantir suporte estrutural ao envoltório nuclear, a lâmina nuclear também é responsável pela ligação das fibras cromatínicas ao envoltório. A observação de que alterações na lâmina afetam várias funções nucleares levou à proposição de funções adicionais para a lâmina nuclear, tais como participação nos processos de replicação e transcrição do DNA, na expressão gênica, na manutenção do citoesqueleto e na sobrevivência da célula.

Mutações nos genes que codificam proteínas presentes ou associadas ao envoltório nuclear causam uma série de doenças genéticas denominadas envelopatias. Dentre as envelopatias, podemos citar as laminopatias, que são causadas por mutações no gene que codifica a lamina A. Várias dessas síndromes já estão descritas na literatura. A distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), ocasionada por uma mutação no gene que codifica a proteína intrínseca emerina, é uma miopatia degenerativa caracterizada por contraturas dos músculos dos calcanhares, cotovelos e pescoço. Com o progresso da doença, a condução cardíaca é alterada, podendo levar o paciente à morte. Outro tipo de mutação que ocorre no gene que codifica a lamina A ocasiona uma distrofia muscular menos grave que a EDMD, mas que também causa anormalidades cardíacas. O diagnóstico precoce dos efeitos cardíacos da doença pode salvar a vida de seus portadores.

O material genético está na forma de cromatina

O termo cromatina (do grego *croma*, cor) designa, com exceção dos nucléolos, toda a porção do núcleo que se cora e é visível ao microscópio de luz. Em células eucariontes, o DNA se complexa com proteínas específicas, constituindo a cromatina. Sua organização é dinâmica, pois se altera de acordo com a fase do ciclo celular e com o seu grau de atividade. No núcleo interfásico, a cromatina se apresenta compactada e/ou descompactada (Figura 8.9). No núcleo em divisão (mitose ou meiose), a cromatina está altamente compactada, constituindo os cromossomos. Assim, a cromatina e os cromossomos representam dois aspectos morfológicos e fisiológicos da mesma estrutura.

A disposição da cromatina no interior do núcleo e o seu grau de condensação variam de um tipo celular para outro e são característicos de cada tipo celular. Além disso, a mesma célula pode apresentar cromatina com vários graus de condensação, de acordo com o estágio funcional e com o estado de diferenciação em que se encontra.

De modo geral, as células nervosas e os espermatócitos (células precursoras dos espermatozoides), em certa fase, apresentam cromatina pouco condensada (Figura 8.10). Os plasmócitos (células produtoras dos anticorpos) apresentam núcleos com grumos densos de cromatina. Os eritroblastos (*eritro*, vermelho, e *blasto*, germe), células que se transformam nos glóbulos vermelhos do sangue, sofrem uma condensação gradual da cromatina durante sua maturação (Figura 8.9), e esse processo culmina, nos mamíferos, com a expulsão do núcleo. Como será estudado mais adiante, o estado de condensação da cromatina tem um significado funcional importante.

A cromatina é constituída por DNA complexado com proteínas

As proteínas que se associam ao DNA para formar a cromatina são classificadas em histônicas e não histônicas. Além disso, sempre que a cromatina é isolada, encontra-se pequena quantidade de RNA associado a ela.

O DNA, segundo o modelo de Watson e Crick, é constituído por duas cadeias de polinucleotídios complementares e antiparalelas, que se associam por pontes de hidrogênio, formando uma dupla hélice com diâmetro de 2 nm (Capítulo 3). A quantidade de DNA por núcleo varia de uma espécie para outra e é característica de cada espécie. Essa quantidade, expressa em pares de bases (pb), é chamada de valor C. As células somáticas, diploides, têm um conteúdo 2C de DNA, enquanto os gametas, que têm um conteúdo de DNA reduzido à metade, apresentam uma quantidade C de DNA. Nos núcleos das células eucariontes, o valor de C varia de 10^7 até 10^{11} pb.

Nos seres vivos, a análise do conteúdo de DNA mostra, em geral, um incremento à medida que se progride na escala evolutiva (Figura 8.11). Entre os vertebrados existem exceções entre o nível evolutivo e o conteúdo de DNA, e o caso mais evidente é o de certos urodelos, com teor cerca de 30 vezes superior ao humano. Nos peixes pulmonados, também se encontram altas taxas de DNA, e, em ambos os casos, desconhece-se o significado biológico desse fenômeno. Essa discrepância na quantidade de DNA entre os organismos foi chamada de paradoxo do valor C, o qual é uma consequência direta da comprovação de que a quantidade de DNA nas células dos vertebrados está acima do teor mínimo necessário para armazenar a informação genética da espécie. Esse fato levou à proposição de que a maior parte do genoma de uma célula eucarionte não é funcional ou tem outras funções que não a codificação de proteínas. Alguns aspectos referentes a esse aparente excesso de DNA serão discutidos mais adiante neste capítulo.

O RNA associado à cromatina representa 3% da sua composição e é constituído, basicamente, de cadeias de RNA nascentes, que ainda estavam associadas à fita molde do DNA no momento em que a cromatina foi isolada.

As fibras cromatínicas apresentam DNA associado a proteínas básicas, as histonas. As histonas são proteínas bastante estáveis, não sendo renovadas constantemente, como a maioria

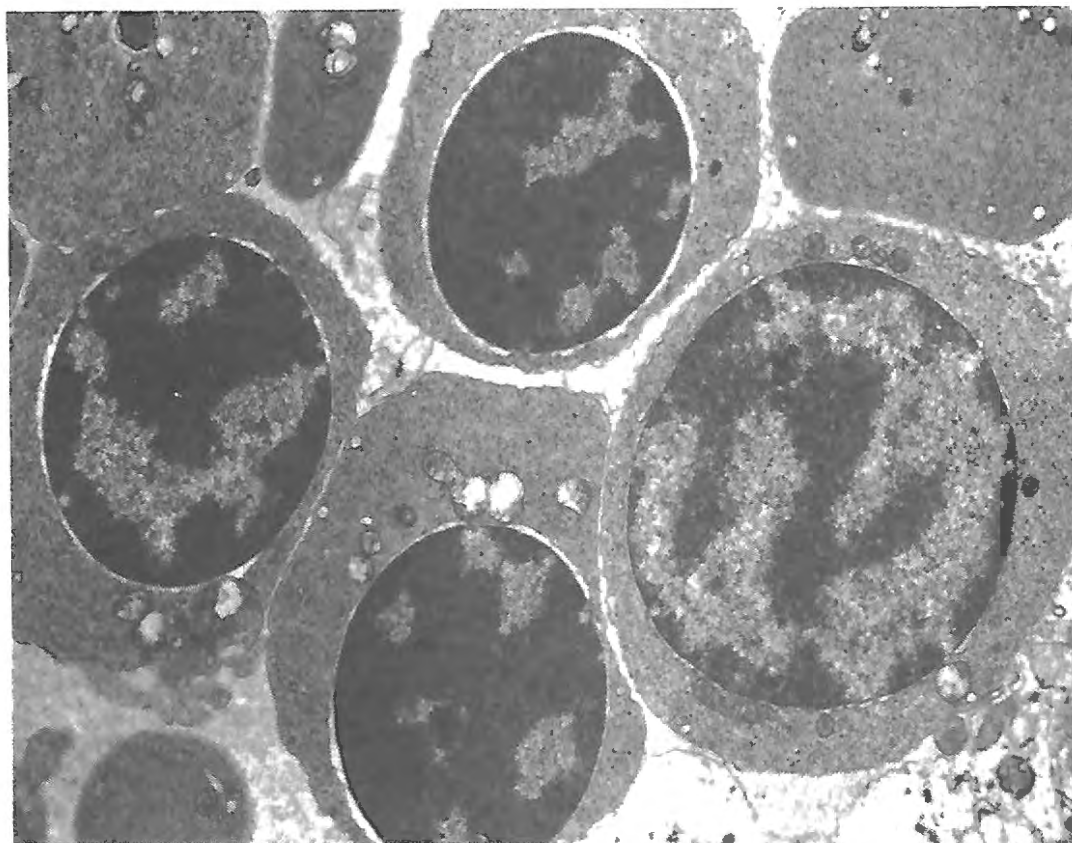



Figura 8.9 ▪ Eletromicrografia de corte de medula óssea. As quatro células que aparecem com seus núcleos são eritroblastos, precursores dos eritrócitos. A cromatina, nesses núcleos, mostra diferentes graus de condensação, e os eritroblastos mais maduros apresentam os núcleos mais condensados. 11.000×.

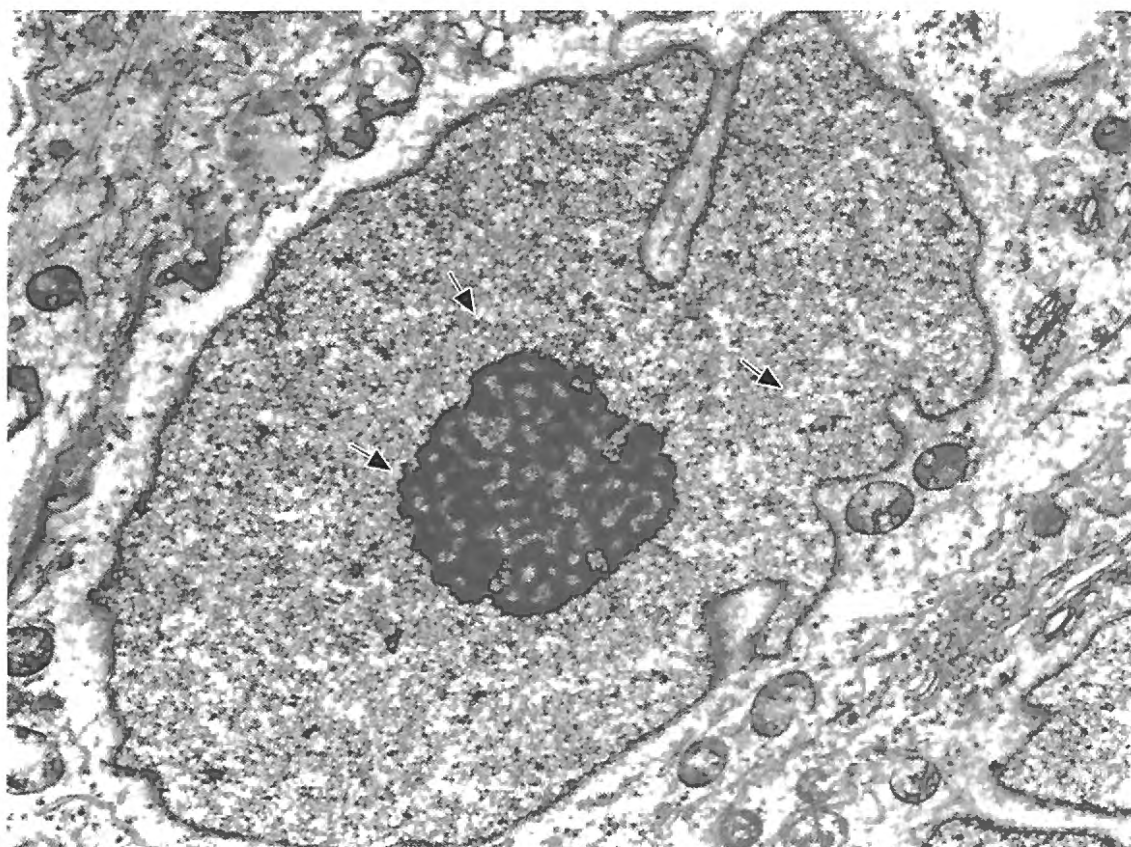



Figura 8.10 ▪ Eletromicrografia de célula do testículo. A cromatina descompactada está uniformemente dispersa no núcleo. As duas membranas que compõem o envoltório nuclear estão bem visíveis. O nucléolo mostra uma estrutura enovelada. 10.000×.

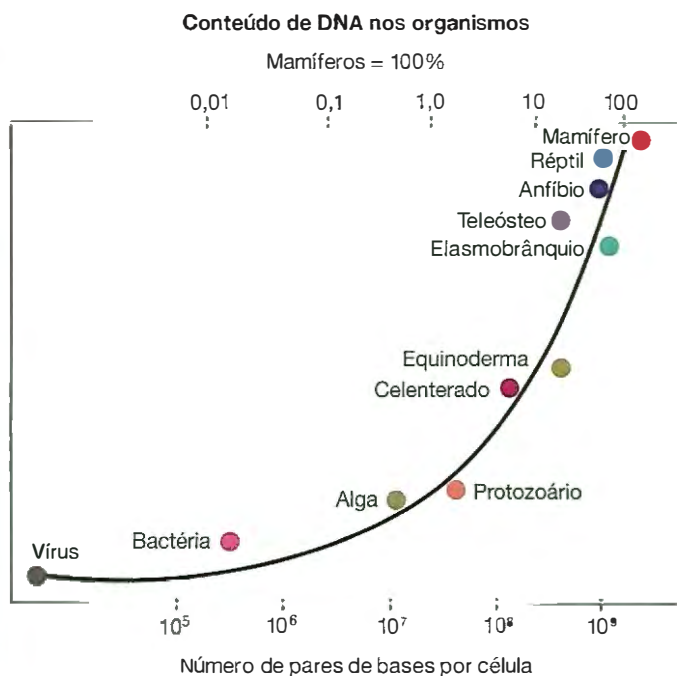



Figura 8.11 ▪ Conteúdo de DNA encontrado na árvore filogenética. (Dados de Hood, L.E. *et al. Molecular Biology of Eucariotic Cells.* Benjamin Publ., 1975.)

das proteínas celulares. A quantidade em massa de histonas é, aproximadamente, igual à do DNA total do núcleo, em uma razão de 1:1. Essas proteínas têm peso molecular baixo e apresentam forte caráter básico, pois são ricas nos aminoácidos básicos (carga positiva), arginina e lisina. Elas se ligam ao DNA graças à interação de seus radicais amino com os radicais fosfato do DNA. Nem todos os radicais fosfato estão neutralizados pelas histonas, o que confere à cromatina um caráter ácido, isto é, uma grande capacidade para ser corada por corantes básicos, propriedade denominada basofilia. Como as bases nitrogenadas não se ligam às histonas, as interações DNA-histonas independem da sequência de nucleotídios do DNA.

Há cinco tipos principais de histonas, classificadas de acordo com seu teor em lisina e/ou arginina: H1, H2A, H2B, H3 e H4. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 são moléculas pequenas, com 102 a 135 aminoácidos. Esses quatro tipos de histonas partilham uma estrutura molecular comum, com as cadeias polipeptídicas constituídas por três sequências dispostas em α-hélice e conectadas por duas sequências filamentosas, que se dispõem como alças (Figura 8.12). Elas apresentam um longo segmento N-terminal composto principalmente por aminoácidos básicos. Os aminoácidos das histonas podem ser acetilados, metilados ou fosforilados, processos que levam a uma modificação da carga eletrostática da histona, alterando sua interação com o DNA e influindo na configuração da fibra cromatínica. Foi observada, por exemplo, uma correlação entre a fosforilação das histonas e as diferentes fases da mitose.

A sequência de aminoácidos dessas histonas se conservou de modo excepcional durante a evolução. As histonas H3 e H4 apresentam sequências idênticas em organismos tão distintos quanto os da ervilha e do boi, sugerindo que elas desempenham funções idênticas em todos os eucariontes. Os tipos H2A e H2B também apresentam sequências idênticas, com algumas variações espécie-específicas. Estudos recentes apontam para a existência de histonas com estruturas variáveis, codificadas por genes diferentes daqueles que codificam as histonas principais. Algumas dessas histonas apresentam grande homologia com as histonas principais, como é o caso das H3.3, H2A.X e H2A.Z. A associação dessas histonas variantes com o DNA seria responsável por alterações na estrutura da cromatina.

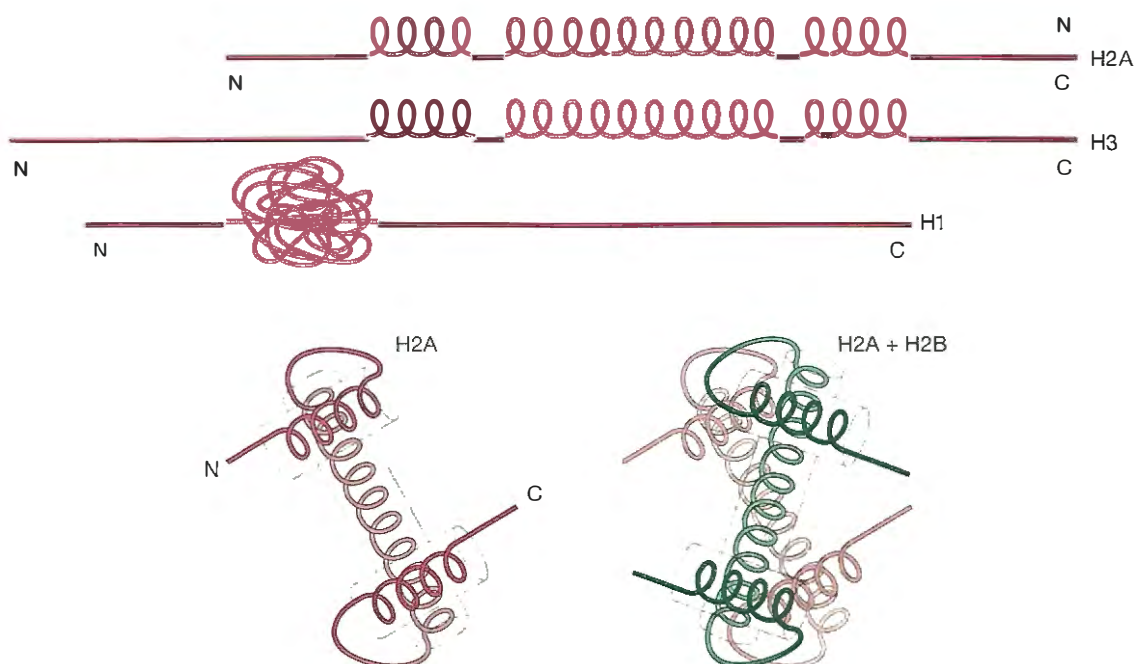



Figura 8.12 ▪ Estrutura geral das histonas H2A, H3 e H1. As histonas H2A e H3 são constituídas por três sequências em α-hélice, conectadas por duas sequências filamentosas. Elas apresentam um longo segmento N-terminal composto principalmente por aminoácidos básicos. A histona H1 apresenta uma região globular, localizada entre dois segmentos filamentosos, N- e C-terminal. As regiões não helicoidais das histonas do centro do nucleossomo dobram-se, favorecendo a formação dos dímeros, que se associam pelas regiões helicoidais. Neste esquema está representado um dímero de H2A e H2B, apenas.

As histonas do grupo H1 contêm cerca de 220 aminoácidos (PM 23.000 dáltons) e apresentam três regiões distintas: uma região globular, em razão do enovelamento da cadeia polipeptídica, localizada entre dois segmentos filamentosos, N- e C-terminal (Figura 8.12). Elas apresentam o menor grau de conservação durante a evolução, havendo variações entre as diferentes espécies e, mesmo, entre diferentes tecidos de uma mesma espécie.

As histonas H1 são caracterizadas como histonas de ligação, uma vez que, como será estudado mais adiante, elas têm função na compactação das fibras de cromatina. Em eritrócitos nucleados de aves, a histona H5 é encontrada em substituição à H1 e desempenha a mesma função.

Nos espermatozoides de alguns peixes, como salmão, tubarão e truta, outro tipo de proteína básica está associado à cromatina: são as protaminas. Nesses espermatozoides, as protaminas substituem as histonas.

Além das proteínas básicas, a cromatina contém proteínas não histônicas, dentre as quais muitas são acídicas. As proteínas não histônicas do núcleo podem estar ligadas ao DNA ou dispersas no nucleoplasma. Elas constituem um grupo muito heterogêneo, no qual estão incluídas todas as proteínas nucleares, com exceção das histonas. As células metabolicamente mais ativas, como os neurônios e as células glandulares, apresentam alto teor de proteínas não histônicas. De acordo com suas atividades funcionais, é possível distinguir os seguintes grupos:

- Proteínas que participam da estrutura dos cromossomos. São mais de 30 proteínas acídicas que têm essa função e que colaboram na organização e compactação do DNA nos cromossomos. Dentre elas, as mais relevantes são a topoisomerase II e a condensina (discutida mais adiante neste capítulo)
- Proteínas relacionadas com os processos de replicação e reparo do DNA, como as DNA polimerases, helicases, topoisomerases etc.
- Proteínas que participam do processo de ativação e repressão gênica. Dentre as proteínas ativadoras, estão aquelas pertencentes ao grupo HMG (do inglês *high mobility group*). Essas proteínas se ligam às fibras cromatínicas, reduzindo sua compactação e ativando, portanto, sua atividade transcricional.

Estrutura molecular da cromatina

A unidade estrutural básica da cromatina foi denominada de nucleossomo. O nucleossomo é uma partícula com forma cilíndrica achatada, com 10 nm de diâmetro e 6 nm de altura (Figura 8.13). Cada nucleossomo é constituído por 200 pares de bases (pb) de DNA associados a um octâmero de histonas. O octâmero é formado por duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As histonas H3 e H4 formam um tetrâmero central, enquanto H2A e H2B formam dois dímeros que se associam perifericamente, em cada lado do tetrâmero.

Quando preparados totais de núcleos submetidos à digestão por proteases são observados ao microscópio eletrônico, as fibras cromatínicas assumem o aspecto de um colar de contas, as quais mantêm certa distância entre si. Análises bioquímicas desse colar de contas revelaram que cada conta é constituída pelo octâmero das histonas H2A, H2B, H3 e H4, em torno do qual se enrola um segmento de DNA com cerca de 146 pb. Essa estrutura foi denominada centro do nucleossomo. Conectando um centro do nucleossomo ao outro, encontra-se um segmento de DNA não associado a histonas com 15 até 80 pb, chamado de DNA de ligação. O nucleossomo, portanto, é constituído pelo centro do nucleossomo mais um dos segmentos do DNA de ligação, totalizando 200 pb de DNA. O colar de contas representa o primeiro nível de compactação da cromatina e apresenta 10 nm de diâmetro, razão pela qual também é chamado de fibra de 10 nm (Figura 8.14).

O segundo nível de compactação da cromatina é representado pela fibra de 30 nm, que se forma quando a histona H1 associa-se ao DNA de ligação que chega ao centro do nucleossomo e o deixa. Imagens obtidas ao microscópio eletrônico mostram que a associação da H1 aos dois segmentos do DNA de ligação causa um entrelaçamento entre esses segmentos, o que faz com que a fibra adquira uma conformação em ziguezague (Figura 8.14). Além da histona H1, também contribuem para a compactação e estabilização da fibra a associação entre as caudas filamentosas das histonas que se projetam do octâmero, bem como a presença de água e de cátions divalentes (como íons Mg^{++} e Mn^{++}) em concentração adequada.

Durante a intérfase, a cromatina que contém os genes codificadores é formada, em sua maioria, por fibras de 30 nm, enquanto cerca de 10% dela está na forma de fibras de 10 nm, permitindo o acesso às enzimas envolvidas na transcrição. A

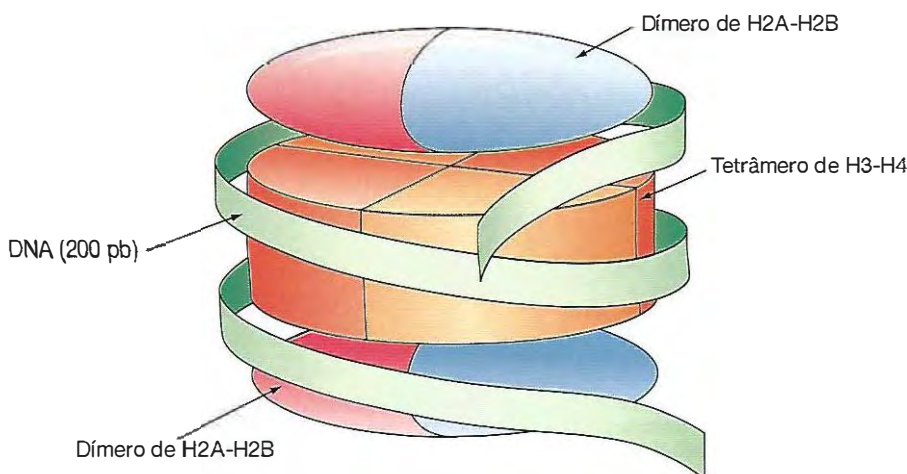



Figura 8.13 ▪ Desenho esquemático do nucleossomo. O DNA em dupla hélice enrola-se em torno do octâmero de histonas H2A, H2B, H3 e H4, constituindo o centro do nucleossomo. As histonas H3 e H4 formam um tetrâmero, de cada lado do qual se associam os dímeros de H2A e H2B. Ao centro do nucleossomo soma-se o DNA de ligação, totalizando 200 pares de bases e constituindo o nucleossomo.

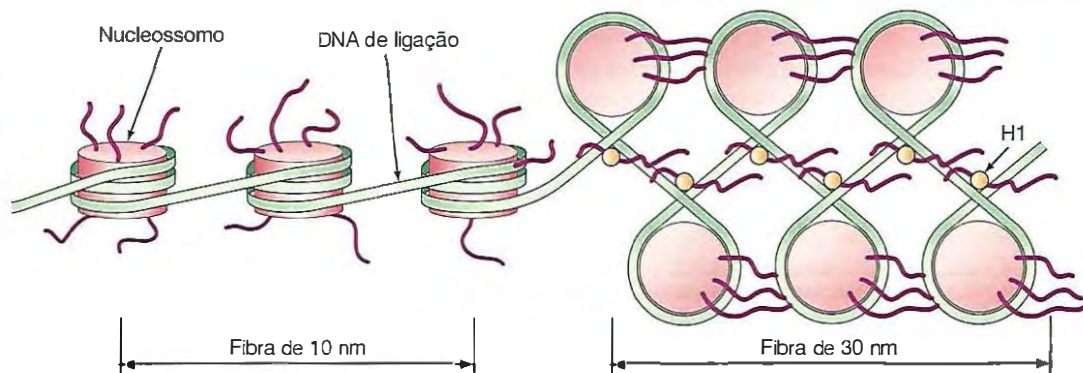



Figura 8.14 ▪ Desenho esquemático das fibras cromatínicas. A porção central do nucleossomo é constituída pelo octâmero de histonas. A associação entre os nucleossomos adjacentes, por intermédio do DNA de ligação, forma a fibra de 10 nm. Quando a histona H1 se liga à fibra de 10 nm, origina a fibra de 30 nm, que mostra uma conformação em zigue-zague. A fibra de 30 nm é mantida principalmente pelas interações entre as caudas filamentosas das moléculas de H1.

adição de radicais acetila às histonas do octâmero desenrola a fibra de 30 nm e leva à formação da fibra de 10 nm, favorecendo a transcrição e tornando a cromatina ativa.

Até o momento, pouco se sabe sobre a organização da cromatina em níveis mais compactados. Níveis superiores de compactação parecem envolver, principalmente, as proteínas não histônicas. As histonas H1 e H3 parecem, no entanto, participar também desse processo de compactação, uma vez que a fosforilação de ambas, durante a prófase, determina a condensação dos cromossomos.

Ainda no núcleo interfásico, as fibras de 30 nm podem organizar-se em grandes alças, que contêm de 50.000 até 200.000 pb, que se prendem ao envoltório nuclear através da lâmina nuclear. As fibras cromatínicas organizadas em alças parecem se ligar às laminas e à matriz nuclear por meio de segmentos específicos do DNA. Esses segmentos constituem as regiões de ligação à matriz ou MAR (do inglês *matrix attachment regions*). Os segmentos MAR apresentam sequências não conservadas, sendo, geralmente, ricas em AT. Sugere-se que essas sequências são necessárias para que ocorra a transcrição e a replicação do DNA, tendo sido identificado, inclusive, um sítio de ligação para a topoisomerase II.

Também cerca de 10% da cromatina interfásica está em um estado altamente condensado, chamado heterocromatina (discutido mais adiante neste capítulo).

Cromatina e expressão da informação genética

Em termos moleculares, um gene pode ser definido como uma sequência de nucleotídios do DNA que é expresso em um produto funcional, ou seja, em uma molécula de RNA ou em uma cadeia polipeptídica.

O genoma das células eucariontes, no entanto, apresenta uma grande quantidade de sequências de DNA que não são convertidas em produtos funcionais, que não são codificadoras. Muitas dessas sequências não codificadoras estão localizadas entre os genes, separando um gene do seu "vizinho". Outras, no entanto, estão presentes nos próprios genes. Esses genes apresentam segmentos codificadores, chamados éxons, separados por segmentos não codificadores, ou íntrons (Figura 8.15). Todo o gene é transcrito em uma longa molécula de RNA, que é processada, reduzida de tamanho e convertida na molécula de RNA funcional.

O processamento das moléculas de RNA ocorre no núcleo e envolve o *splicing*, que consiste na remoção e digestão dos íntrons e na posterior junção dos éxons (Figura 8.15). Assim, apenas os éxons são mantidos no RNA maduro. O *splicing* é muito complexo e preciso, porque a molécula de RNA deve ser clivada em locais exatos, e os éxons devem ser ligados também de maneira exata. O processo de clivagem dos RNA e a posterior ligação das partes que formarão a molécula madura envolvem moléculas de RNA, em vez de enzimas. Como mencionado no Capítulo 3, o RNA pode ter atividade catalítica. Essas moléculas de RNA têm baixos pesos moleculares, sendo por isso chamadas de snRNA (do inglês *small nuclear* RNA). No *splicing* do mRNA participam cinco moléculas distintas de snRNA, quais sejam, U1, U2, U4, U5 e U6. Os snRNA complexam-se com proteínas, constituindo snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*), que, por sua vez, associam-se com outras enzimas e constituem o *spliceossomo*.

Nos organismos eucariontes, a grande maioria dos genes contém íntrons. Constituem exceções os genes que codificam as histonas e os intérferons em aves e mamíferos. Não se sabe ainda se a presença dos íntrons é necessária à atividade gênica.

O primeiro passo na expressão de um gene é a sua transcrição (Figura 8.16) em uma molécula de RNA. A principal enzima responsável pela transcrição é a RNA-polimerase, que catalisa a polimerização dos ribonucleosídios trifosfatados (ATP, CTP, GTP e UTP) na presença dos íons Mg^{2+} e Mn^{2+}. Apenas uma das fitas do DNA é usada como molde; assim, a molécula de RNA transcrita é complementar à fita de DNA que lhe deu origem e idêntica à outra fita de DNA, sendo os nucleosídios de timina substituídos pelos de uracila. Para um determinado gene, sempre a mesma fita de DNA é copiada, e o crescimento da cadeia de RNA ocorre sempre no sentido 5'→3'.

Em células eucariontes, há três tipos de RNA-polimerase, cada uma delas responsável pela transcrição de um tipo de RNA. A RNA-polimerase I transcreve os rRNA nucleolares, ou seja, os rRNA 28S, 5,8S e 18S; a RNA-polimerase II sintetiza os mRNA e alguns snRNA; a RNA-polimerase III transcreve os tRNA, a molécula de rRNA 5S e alguns snRNA.

A RNA-polimerase não depende de um *primer* (iniciador) para iniciar a síntese. A sequência do DNA na qual a RNA-polimerase se liga para iniciar a transcrição de um gene contém

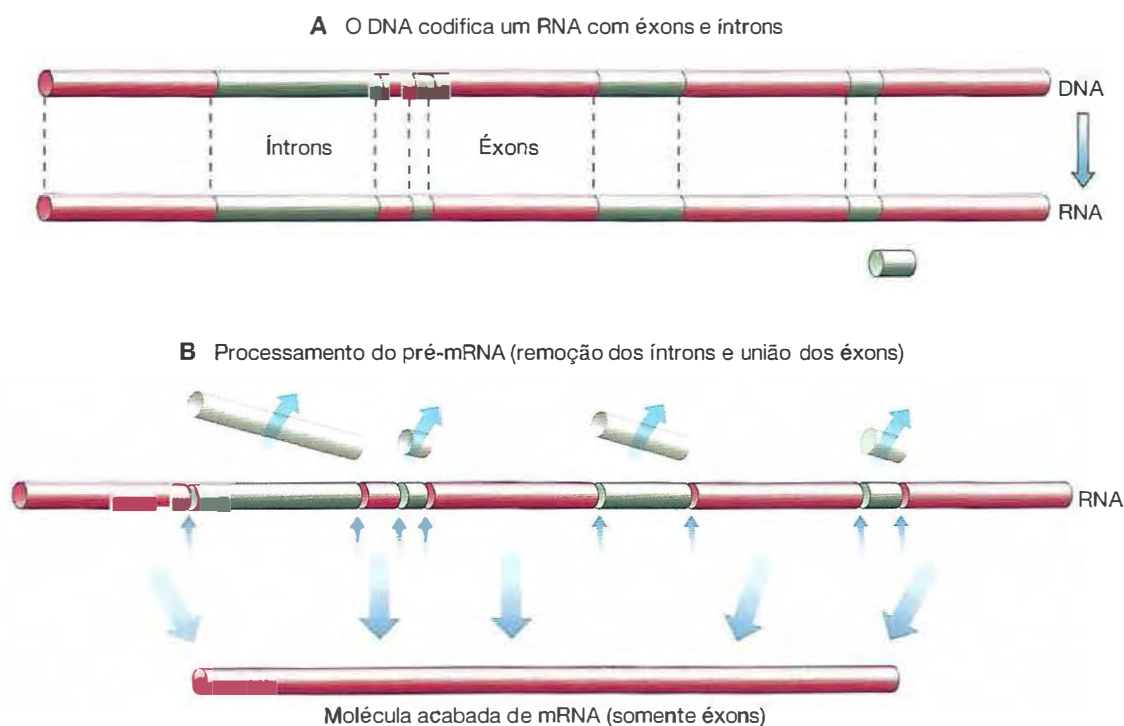



Figura 8.15 ▪ Esquema do *splicing* que ocorre no núcleo. **A.** O RNA é sintetizado sobre um molde de DNA, contendo segmentos codificadores ou éxons e segmentos não codificadores ou íntrons. **B.** Os íntrons são removidos da molécula de RNA, inicialmente formada, por um processo complexo que envolve snRNA. Em seguida, o RNA mensageiro acabado, constituído exclusivamente por éxons, migra para o citoplasma, no qual irá ser traduzido em cadeia polipeptídica.

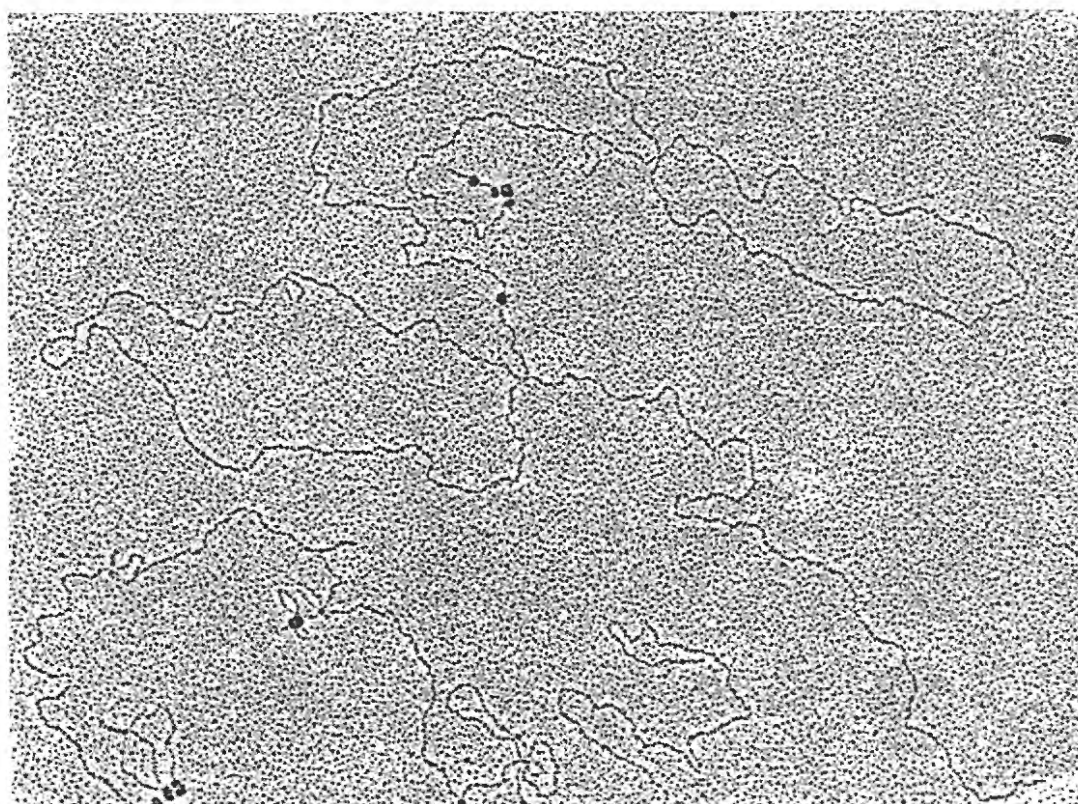



Figura 8.16 ▪ Micrografia eletrônica que mostra o complexo formado pela RNA-polimerase com o DNA durante a síntese de RNA (transcrição). O DNA aparece como um filamento em que se fixam as unidades de polimerase, que aparecem como grânulos densos. 40.000x. (Cortesia de R. Portmann, J.M. Sogo, K. Kollerg e W. Sillig. *F.E.B.S. Letters*, **45**:64, 1964.)

cerca de 40 pb e é chamada de promotor. Depois de se ligar ao promotor, a RNA-polimerase abre uma região da hélice para expor a sequência de nucleotídios que irá ser transcrita. Um dos dois filamentos do DNA que estão expostos serve como molde para o pareamento complementar dos ribonucleosídios trifosfatados, que são ligados um a um pela RNA-polimerase. A molécula de RNA-polimerase se move ao longo da molécula de DNA, desenrolando a dupla hélice do DNA e expondo outra sequência de nucleotídios para servir como molde. Dessa maneira, a molécula de RNA é alongada pela adição de um nucleotídio de cada vez na direção 5'→3'. O processo de elongação da cadeia continua até que a enzima encontra uma sequência especial de nucleotídios no DNA molde, o sinal de término, quando então a polimerase interrompe a síntese. Terminada a transcrição, a polimerase libera o DNA molde, a dupla hélice se refaz e a recém-sintetizada molécula de RNA é liberada no nucleoplasma, no qual será processada.

Os genes podem estar repetidos

O DNA das células eucariontes pode apresentar três diferentes graus de repetição de suas sequências nucleotídicas, caracterizando três categorias de genes: os de cópia única, os medianamente repetitivos e os altamente repetitivos. Nos genes de cópia única, cada sequência de nucleotídio está presente apenas uma vez por genoma haploide. Provavelmente, a essa categoria pertence a maioria dos genes estruturais, isto é, aqueles que codificam proteínas. Essa fração é a mais abundante, constituindo aproximadamente 58% do genoma de mamíferos, 54% do de anfíbios e 33% daquele de células vegetais.

A segunda categoria, quantitativamente menor que a primeira, apresenta sequências nucleotídicas que se repetem um moderado número de vezes. Geralmente, existem entre 100 e 10.000 cópias de cada um desses genes no genoma. Todos os eucariontes contêm DNA medianamente repetitivo e sua proporção aumenta na escala evolutiva com o aumento do tamanho do genoma. Os genes mais representativos dessa classe são os que codificam o RNA ribossômico e aqueles que codificam as histonas. Em quase todos os eucariontes são encontradas, por genoma haploide, mais de 100 cópias de genes do RNA ribossômico. Os genes que codificam as histonas também são medianamente repetitivos: de 30 a 40 cópias ocorrem no homem, 100 na *Drosophila* e de 300 a 1.000 no ouriço-do-mar, por exemplo. Outro exemplo de DNA medianamente repetitivo é representado pelos elementos genéticos de transposição ou transposons, que são sequências de DNA que se movem de um local para outro em um cromossomo ou mesmo para um cromossomo diferente. Eles foram detectados em organismos tão diversos quanto bactérias, fungos, vírus, vegetais superiores e insetos. A capacidade de transposição dessas sequências tem acarretado muita especulação sobre seu possível envolvimento na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento e seu papel na evolução dos genomas eucariontes.

A terceira fração de DNA, que constitui a fração minoritária, apresenta sequências nucleotídicas altamente redundantes, acima de 10.000 cópias de cada gene. Essas sequências são curtas, estão restritas a regiões específicas do genoma e constituem o chamado DNA satélite. Essas sequências foram assim denominadas por apresentarem densidades de flutuação distintas, sendo isoladas do restante do DNA como bandas satélites, por ultracentrifugação em gradientes de densidade. Em camundongos e em *Drosophila*, esse DNA altamente repetitivo está localizado nas regiões centroméricas dos cromossomos.

O número de cópias de um gene pode ainda ser aumentado em diferentes fases do desenvolvimento, em resposta a estímulos específicos, por um processo de amplificação gênica. Enquanto a redundância é um fenômeno filogenético, a amplificação representa um fenômeno essencialmente ontogenético. Por meio desse mecanismo, uma célula pode, durante a vida do indivíduo, produzir cópias adicionais de um gene e, assim, aumentar rapidamente a produção de um determinado RNA. A amplificação é um fenômeno não muito comum e pode ocorrer tanto em sequências únicas de DNA como em *loci* redundantes. Como exemplos de amplificação, podem ser citados alguns pufes dos cromossomos politênicos, que apresentam aumento do teor de DNA, evidenciável pela reação de Feulgen. O gene produtor da proteína coriônica do ovário de *Drosophila* também é amplificado. Como será discutido mais adiante, os genes responsáveis pela síntese do RNA ribossômico, além de redundantes, são amplificados em muitos organismos.

Estados funcionais da cromatina

Os primeiros estudos ao microscópio de luz revelaram, no núcleo interfásico, dois padrões distintos de coloração da cromatina: uma porção de coloração intensa, que foi denominada heterocromatina, e outra, menos corada e mais homogênea, denominada eucromatina. Originalmente, esses dois tipos de cromatina foram identificados pelos seus diferentes estados de compactação. Sabe-se atualmente que existem, pelo menos, duas formas de eucromatina: cerca de 10% na forma de cromatina ativa, que é menos condensada, enquanto o restante, mais condensado, é eucromatina inativa. Em contrapartida, em um nível maior ainda de compactação, encontra-se a heterocromatina, que não é transcrita em RNA, permanecendo sempre inativa. A mesma fibra cromatínica pode apresentar regiões eucromáticas contínuas com regiões heterocromáticas. Assim, o material genético é organizado de modo que diferentes estados de compactação sejam mantidos lado a lado, possibilitando a ocorrência de alterações cíclicas no nível de compactação da cromatina entre a intérfase e a divisão e entre as diferentes fases da vida da célula.

É na forma de cromatina ativa que o DNA se expressa na célula, pois apenas nessa forma ele pode ser transcrito nos diferentes tipos de RNA. O processo de transcrição ocorre somente durante a intérfase, sendo interrompido na divisão celular. Com a compactação da cromatina, na prófase, as enzimas envolvidas na transcrição não conseguem ter acesso às moléculas de DNA. A transcrição é retomada no final da telófase, quando ocorre a descondensação.

Há evidências de que a atividade transcricional da cromatina é aumentada por modificações que envolvem acetilação e ubiquitinação das histonas. A adição de radicais acetila aos segmentos N-terminais das histonas H2A, H2B, H3 e H4, pre-

sentes na região central do nucleossomo, diminui a interação dessas proteínas com o DNA. Assim, a fibra de 30 nm torna-se mais instável, o que impede uma compactação maior da cromatina e favorece a transcrição. Os radicais acetila são adicionados às histonas durante a fase S da intérfase e são removidos antes do início da mitose.

A ubiquitinação envolve a adição da proteína ubiquitina às histonas H2A e H2B. A ubiquitina é uma proteína não histônica, acídica, que reduz o caráter básico das histonas H2A e H2B, levando a alterações estruturais dos nucleossomos. Essas alterações fazem com que o DNA que envolve o octâmero de histonas fique mais acessível à RNA polimerase.

Além disso, a histona H1 parece estar menos intimamente ligada ao DNA na cromatina ativa, e subtipos dessa histona podem ser específicos desse tipo de cromatina.

A heterocromatina, que está compactada durante toda a intérfase e é transcricionalmente inativa, também é duplicada mais tardiamente no período S da intérfase. As células interfásicas contêm dois tipos de heterocromatina: a heterocromatina constitutiva e a heterocromatina facultativa.

A heterocromatina constitutiva é formada por sequências gênicas altamente repetitivas, que nunca são transcritas. Essas sequências se localizam em regiões específicas do cromossomo, principalmente no centrômero, nos telômeros e em torno das constrições secundárias.

A heterocromatina facultativa é a parte da heterocromatina que, em um mesmo organismo, se apresenta condensada em algumas células e descondensada em outras. Pode conter sequências gênicas em cópias únicas ou medianamente repetitivas, passíveis de transcrição, mas que são inativadas. O exemplo clássico desse tipo de heterocromatina é o cromossomo X das fêmeas de mamíferos. Um dos dois cromossomos X na fêmea é inativado ainda durante a vida intrauterina. A inativação ocorre quando uma ou as duas moléculas de histona H2A do octâmero são substituídas por uma variante da H2A chamada macro H2A. Essa substituição altera a estrutura do octâmero, aumentando a estabilidade do core nucleossômico e não permitindo o acesso da RNA polimerase II ao DNA, impedindo sua transcrição. Esse processo ocorre ao acaso; em algumas células o cromossomo X condensado é de origem materna e, em outras, de origem paterna. Em consequência, o corpo da mulher é um mosaico que contém, possivelmente em todos os órgãos, células com o cromossomo X paterno inativo e outras com o cromossomo X materno inativo. O cromossomo X heterocromático é observado no núcleo como uma partícula esférica que se cora fortemente, à qual se dá o nome de cromatina sexual. Essa cromatina se apresenta sob diferentes formas; por exemplo, nos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos, ela aparece como uma protuberância do núcleo em forma de raquete, enquanto, em células do epitélio bucal, ela aparece como uma partícula ligada ao envoltório nuclear. A presença ou não da cromatina sexual permite o diagnóstico citológico do sexo.

O tamanho do nucléolo varia com a atividade celular

Os nucléolos são estruturas nucleares esféricas não envolvidas por membrana (Figuras 8.1 e 8.10), presentes em todas as células eucariontes nucleadas. Eles são facilmente vistos ao microscópio de luz, graças ao seu tamanho, que pode variar de 1 até 7 μm, de acordo com o tipo celular e o estado funcional da célula. O tamanho dos nucléolos está, em geral, relacionado com a intensidade da síntese proteica que ocorre no citoplasma. As células que sintetizam proteínas ativamente, ou por secretarem proteínas, ou por se reproduzirem frequentemente, têm nucléolos maiores que outros tipos celulares.

A forma e a organização estrutural dos nucléolos variam bastante entre os diferentes tipos celulares e dependem de sua atividade funcional. Em células que apresentam alta atividade de produção de ribossomos, os nucléolos são geralmente grandes e complexos. Nucléolos pequenos, em forma de anel, são encontrados em células que produzem poucos ribossomos, como os linfócitos e monócitos do sangue.

Apesar de existirem núcleos com dois ou mais nucléolos, geralmente o nucléolo é único (Figura 8.10).

Os nucléolos são estruturas dinâmicas, que se fragmentam na prófase da mitose e se reorganizam na telófase. A fragmentação dos nucléolos ocorre pela ação de proteínas (descritas no Capítulo 9) que fosforilam alguns componentes do complexo que transcreve as moléculas de rRNA, inativando esse complexo e interrompendo a transcrição. Quando esses componentes são desfosforilados, a transcrição é retomada, com a consequente reorganização do nucléolo.

Composição química e ultraestrutura do nucléolo

Com o auxílio de ultrassom, é possível romper os núcleos, liberando assim os nucléolos, que podem, então, ser isolados por centrifugação fracionada. A análise dessas frações mostra que os nucléolos são estruturas densas que contêm em torno de 60% de matéria seca, principalmente proteínas e RNA ribossômico. Apresentam também pequena quantidade de DNA, correspondente à cromatina que contém os genes codificadores dos rRNA, denominado DNA ribossômico (rDNA).

Além das proteínas estruturais, são encontrados no nucléolo proteínas e rRNA que irão compor as subunidades ribossômicas, bem como enzimas, proteínas e RNA que participam da transcrição e das modificações pós-transcricionais dos rRNA. Várias dessas proteínas já têm funções bem estabelecidas, tais como, entre outras: a RNA polimerase I, que é responsável pela transcrição do rDNA, as topoisomerases I e II que participam da descondensação e do relaxamento do rDNA; o UBF (do inglês *upstream binding factor*), um fator envolvido na transcrição do rRNA; a nucleolina, que participa da transcrição do rDNA e do processamento do rRNA e a fibrilarina. Além disso, estão presentes no nucléolo RNA de baixo peso molecular, os snoRNA (do inglês *small nucleolar* RNA), que podem estar complexados com proteínas, constituindo as snoRNP. Um exemplo de snoRNP, formado pela complexação do snoU3 com a proteína fibrilarina, é responsável pela clivagem inicial do rRNA.

Ao microscópio eletrônico, três componentes morfologicamente distintos são vistos no nucléolo: (a) o centro fibrilar, elétron-lúcido e frequentemente em forma circular; (b) o componente fibrilar denso, que contém fibrilas muito finas,

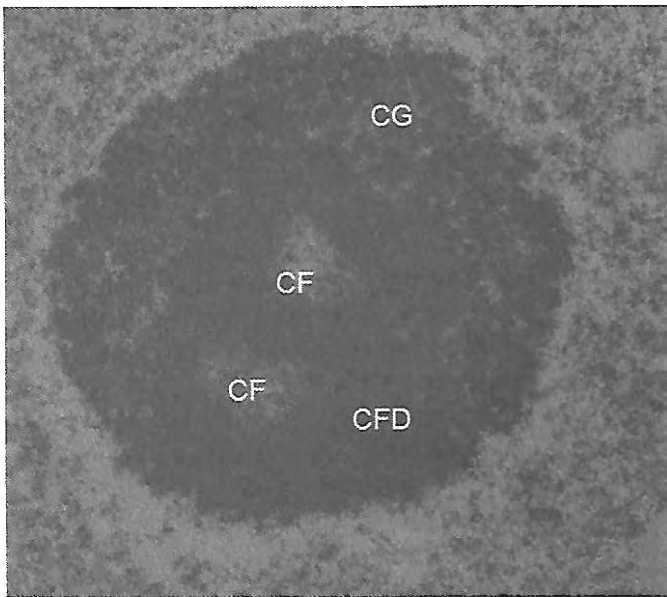



Figura 8.17 ▪ Eletromicrografia do núcleo de uma célula de gametófito de *Rhynchospora pubera* que mostra um nucléolo. Dois centros fibrilares (CF) elétron-lúcidos localizados no centro do nucléolo estão envoltos pelo componente fibrilar denso (CFD). Enquanto o CFD é homogêneo e bastante elétron-denso, o componente granular (CG) mostra um aspecto granular, condizente com sua função. 18.500x. (Cortesia de J. A. B. San Martin.)

com 3 a 5 nm de diâmetro, que podem formar uma rede e (c) o componente granular, constituído por grânulos com 15 nm de diâmetro (Figura 8.17). Esses componentes representam os locais de transcrição e processamento do rRNA e de montagem das subunidades ribossômicas.

Na maioria dos nucléolos, os três componentes apresentam um arranjo concêntrico. O centro do nucléolo aparece pouco contrastado quando observado ao microscópio eletrônico (Figura 8.17). Nessa região está localizado o centro fibrilar, que contém o rDNA, as moléculas de RNA-polimerase I, as DNA-topoisomerases I e II, bem como os fatores de transcrição do rRNA. Os centros fibrilares são envolvidos, total ou parcialmente, pelo componente fibrilar denso, no qual são encontradas moléculas de rRNA recém-transcrito e as enzimas envolvidas no processamento pós-transcricional do rRNA. A porção mais externa contém o componente granular, em que ocorre o processamento final do rRNA e é, portanto, constituído por grânulos de rRNA complexados com proteínas (Figura 8.17).

Os genes que codificam os rRNA estão localizados e são transcritos nos centros fibrilares ou no limite entre os centros fibrilares e o componente fibrilar denso. O processamento do rRNA e a sua complexação com proteínas inicia-se no componente fibrilar denso, continuando no componente granular, no qual as subunidades ribossômicas estão em processo final de montagem.

▪ Biogênese de ribossomos

Os genes que codificam o rRNA estão localizados em porções de fibras cromatínicas que, após sua compactação, irão constituir as constrições secundárias de cromossomos específicos. Essas regiões foram denominadas regiões organizadoras do nucléolo ou NOR (do inglês *nucleolar organizing regions*). O número e a localização das NOR variam de uma espécie para outra. Na espécie humana, por exemplo, as NOR estão localizadas nas constrições secundárias de 5 pares de cromossomos acrocêntricos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22), enquanto em feijão ela é encontrada em apenas um par de cromossomos.

O número de NOR de uma espécie não reflete o de nucléolos daquela espécie, embora determine o número máximo por núcleo. Na espécie humana, que contém 10 NOR por genoma diploide, a maioria das células apresenta um único nucléolo. Esse fenômeno pode ser explicado porque, durante a biogênese do nucléolo, que ocorre na telófase, pode ocorrer tanto a associação das diferentes NOR que transcrevem um único nucléolo, como a fusão de pequenos nucléolos, individualmente formados, em um único grande nucléolo.

Em células eucariontes, os genes que codificam os rRNA estão presentes em múltiplas cópias por genoma. As células humanas contêm cerca de 400 cópias do gene para o rRNA, dispersas em 5 pares de cromossomos, enquanto células de *Xenopus* contêm cerca de 600 cópias desse gene em um único par de cromossomos. As várias cópias do gene estão arranjadas *in tandem*, ou seja, repetidos em sequência, estando cada gene separado do próximo por um segmento de DNA não transcrito ou NTS (do inglês *no transcribed spacer*), que se constitui em um espaçador intergênico. Assim, o rDNA apresenta sequências transcritas alternadas com sequências não transcritas. Cada sequência transcrita contém de 8.000 a 13.000 pb, enquanto, nas sequências não transcritas, esse número varia muito entre as espécies.

▪ Síntese e processamento do rRNA

Os genes que codificam o rRNA são transcritos pela RNA-polimerase I, e cada gene produz o mesmo transcrito primário. Em células de eucariontes superiores, esse transcrito primário é uma molécula de rRNA com cerca de 13.000 nucleotídios e coeficiente de sedimentação de 45S, denominada pré-rRNA (Figura 8.18). O pré-rRNA contém, nas extremidades 5′ e 3′, dois espaçadores transcritos externos, ETS (sigla originária do termo em inglês), e dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2. Antes de sair do núcleo na forma de subunidades ribossômicas, o pré-rRNA é clivado para retirar esses espaçadores e produzir uma cópia de cada uma das moléculas finais de rRNA: o rRNA 28S (com 5.000 nucleotídios), o rRNA 18S (com 2.000 nucleotídios) e o rRNA 5,8S (com 160 nucleotídios). As sequências de nucleotídios que são retiradas de cada molécula de rRNA são degradadas no núcleo.

À medida que a RNA-polimerase I transcreve o rDNA (DNA que codifica rRNA), proteínas são adicionadas às moléculas dos pré-rRNA nascentes, formando partículas de pré-ribonucleoproteínas (pré-rRNP). A molécula de rRNA 45S presente em cada partícula de pré-rRNP é então clivada, pelas snoRNP, em sequências específicas para formar as moléculas maduras de rRNA (Figuras 8.18 e 8.19).

A molécula de rRNA 45S (transcrito primário) é, inicialmente, quebrada em duas, uma com 32S e a outra com 20S. A molécula de rRNA 20S é clivada, originando o rRNA 18S, enquanto a clivagem da molécula de rRNA 32S origina

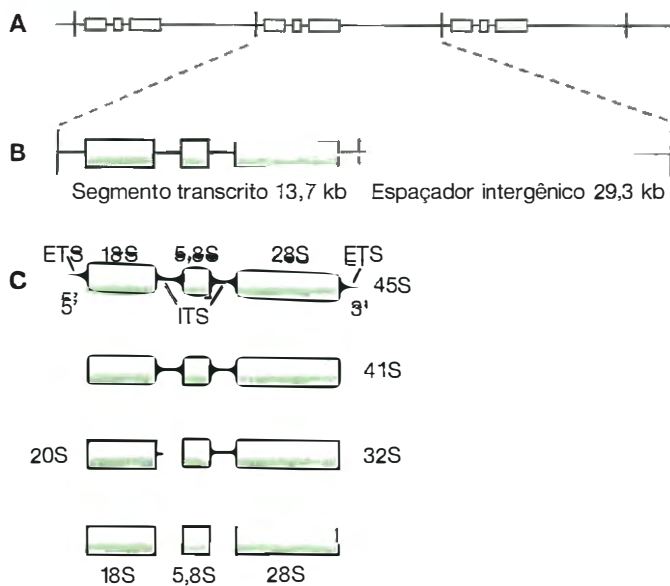



Figura 8.18 ▪ Representação esquemática dos genes e do processamento do rRNA. **A.** Os genes que codificam o rRNA estão dispostos em sequência e são separados pelas sequências não transcritas ou NTS. **B.** Representação de um gene que codifica o rRNA, o qual mostra o segmento que é transcrito e o espaçador entre um gene e o seu "vizinho". É indicado o número de pares de bases de cada um desses segmentos. **C.** As sequências de clivagem que ocorrem na molécula do rRNA que é transcrita, ou seja, o rRNA 45S ou transcrito primário. No rRNA 45S são mostrados os espaçadores transcritos externos (ETS) e os espaçadores transcritos internos (ITS), bem como os segmentos que originarão os rRNA finais 28S, 18S e 5,8S. O rRNA 5S não está representado, uma vez que ele é transcrito em uma região externa ao nucléolo.

as moléculas de rRNA 28S e 5,8S. Esse padrão de processamento é observado em células humanas, enquanto, em outras espécies, existem diferenças na ordem de algumas clivagens.

Além da clivagem, durante o processamento ocorrem também metilações nas riboses dos pré-rRNA e a isomerização de uma centena de moléculas de uridina, que são convertidas a pseudouridina. Em células humanas, cerca de 100 grupos metil são adicionados às moléculas de rRNA durante sua transcrição e poucos grupos metil são adicionados depois da transcrição. Todos esses radicais metil são preservados durante o processamento, de maneira que eles podem ser detectados nas moléculas maduras dos rRNA. A metilação provavelmente protege o rRNA das clivagens, de modo que o rRNA em processamento só é clivado em pontos não metilados. Essas modificações dos pré-rRNA têm também, provavelmente, alguma função na montagem dos ribossomos.

Os genes que codificam o rRNA 5S (com 120 nucleotídios) não estão presentes no rDNA, ou seja, esses genes estão localizados em outra região do DNA, que não a NOR. Assim, esse rRNA é transcrito fora do nucléolo e separadamente das outras moléculas de rRNA. Esses genes também estão presentes em cópias múltiplas por genoma, e as células humanas contêm cerca de 2.000 cópias desse gene também arranjadas *in tandem*. Os genes que codificam o rRNA 5S são transcritos pela RNA polimerase III. O rRNA 5S não é processado, como os outros rRNAs. Esse rRNA, depois de transcrito, migra para o nucléolo, onde é complexado com os rRNAs 28S e 5,8S e proteínas para formar a subunidade maior do ribossomo (Figura 8.19).

Montagem das subunidades ribossômicas

A montagem das subunidades ribossômicas envolve a complexação das moléculas dos rRNAs 18S, 28S, 5,8S e 5S com proteínas. Esse processo está esquematizado na Figura 8.19. Os genes que codificam as proteínas ribossômicas são transcritos fora do nucléolo pela RNA-polimerase-II. Essas proteínas são sintetizadas no citoplasma e importadas pelo núcleo. Aproximadamente 49 tipos diferentes de proteínas serão adicionados aos rRNA 28S, 5,8S e 5S para constituir a subunidade maior, e em torno de 33 tipos se associarão ao rRNA 18S para formar a subunidade menor.

Mais da metade das proteínas ribossômicas associa-se ao pré-rRNA no momento de sua transcrição. As proteínas restantes, bem como o rRNA 5S, são incorporadas nas pré-subunidades ribossômicas à medida que ocorrem as clivagens. A subunidade ribossômica menor, que contém apenas a molécula do rRNA 18S, torna-se madura mais rapidamente que a subunidade maior, que contém os demais rRNA. Há evidências sugestivas de que algumas proteínas são adicionadas à subunidade maior apenas quando ela já está no citoplasma. Uma dessas proteínas, caracterizada em fungos, liga-se e desliga-se da subunidade maior e é responsável pela união entre as duas subunidades no momento da tradução. Esse comportamento indica sua participação na regulação do processo de síntese proteica.

Como elucidado anteriormente neste capítulo, a exportação das subunidades ribossômicas para o citoplasma envolve o sistema Ran-GTPase e proteínas do complexo de poro, que funcionam como trilhos para o transporte das subunidades. Além disso, as proteínas presentes nas subunidades apresentam o sinal de exportação nuclear (rico no aminoácido leucina), que é reconhecido por uma molécula de exportina, liga-se a ela e a subunidade é transportada.

Outras funções do nucléolo

O nucléolo desempenha outras funções além daquelas tradicionalmente conhecidas na biogênese e montagem das subunidades ribossômicas. Uma delas é a maturação da partícula reconhecedora do sinal (PRS), que, como será estudado no Capítulo 10, é um complexo de RNA de baixo peso molecular com proteínas. A PRS reconhece as proteínas a serem secretadas e destina-as para as membranas do retículo endoplasmático rugoso. Sabe-se que no nucléolo ocorre a complexação do RNA pequeno com proteínas para montar a partícula, embora não esteja ainda determinado qual dos componentes nucleolares é responsável por esse processo.

O nucléolo está envolvido, também, na complexação de RNA e proteínas na montagem da telomerase (discutida mais adiante neste capítulo) e no processamento de alguns tRNA.

Nucleoplasma

O nucleoplasma é constituído por uma solução aquosa de proteínas, RNA, nucleosídios, nucleotídios e íons, na qual estão mergulhados os nucléolos e a cromatina. Os RNA são chamados heterogêneos, pois apresentam diferentes tamanhos e,

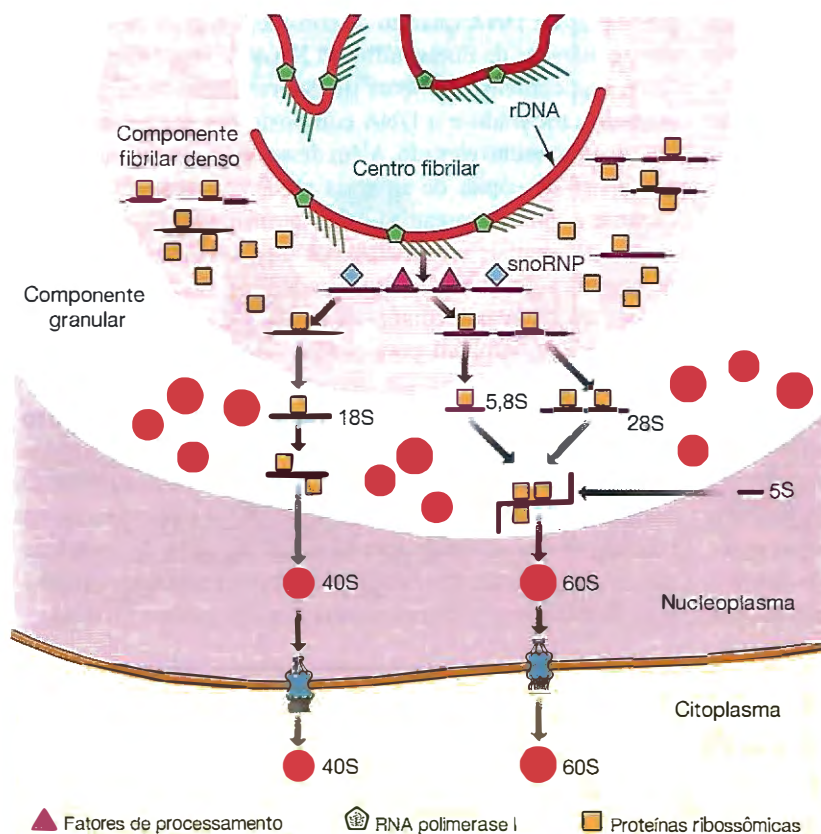



Figura 8.19 • Representação esquemática dos componentes do nucléolo e da montagem das subunidades ribossômicas. A transcrição do rDNA pela RNA polimerase I ocorre nos centros fibrilares (CF) ou no limite entre os CF e o componente fibrilar denso (CFD). O rDNA apresenta sequências codificadoras que são transcritas, intercaladas com sequências espaçadoras, não transcritas. As moléculas de rRNA 45S transcritas são clivadas e processadas pelas snoRNP no CFD. Esse processamento envolve também a adição de proteínas e leva à formação das fibrilas de RNP presentes no CFD. No componente granular (CG) essas moléculas são adicionadas de mais proteínas e adquirem o formato de grânulos, ou seja, formam as subunidades ribossômicas. O rRNA 5S, transcrito a partir de um gene localizado fora do nucléolo, é importado pelo nucléolo, no qual se complexa com as moléculas de rRNA 18S e 5,8S. Essas moléculas, adicionadas de mais proteínas, formam as subunidades maiores do ribossomo, com coeficiente de sedimentação de 60S. Às moléculas de rRNA 18S são adicionadas mais proteínas, formando as subunidades menores do ribossomo, com 40S. Essas subunidades, exportadas por meio dos complexos de poro do envoltório nuclear, alcançam o citoplasma, no qual irão ligar-se às moléculas de mRNA para realizar a síntese de proteínas.

consequentemente, pesos moleculares. Muitas das proteínas presentes no nucleoplasma são enzimas envolvidas com a transcrição e com a duplicação do DNA, como as RNA-polimerases, DNA-polimerases, topoisomerases, helicases, entre outras.

A associação das técnicas de extração, fracionamento e microscopia eletrônica demonstrou a existência, no núcleo, de um endoesqueleto: a matriz nuclear. Após a digestão do DNA com DNase e a extração da maioria das proteínas nucleares, a estrutura resultante mantém o tamanho e a forma originais do núcleo. Essa estrutura é constituída por três componentes: a lâmina nuclear, a estrutura nucleolar e uma rede fibrilar interna, a matriz nuclear. Várias proteínas foram detectadas na matriz, tais como laminas A, matrinas, metaloproteínas (que se ligam a metais), actina e um tipo especial de miosina I. As laminas A do endoesqueleto são mais estáveis e ocorrem em menor quantidade, quando comparadas com as laminas associadas à lâmina nuclear. Há controvérsias, no entanto, sobre a organização dessas proteínas em uma rede tridimensional, em um endoesqueleto.

O núcleo interfásico é estruturado em compartimentos distintos, conhecidos como domínios nucleares. A matriz participaria na organização desses compartimentos no espaço nuclear. As fibras cromatínicas, por exemplo, ocupam locais específicos no interior do núcleo, os chamados territórios cromossômicos. A eucromatina, constituída por DNA rico em genes codificadores, localiza-se preferencialmente no centro do núcleo, enquanto a heterocromatina, cujo DNA contém sequências altamente repetitivas, não codificadoras, localiza-se na periferia. Essa disposição favorece o silenciamento dos genes da heterocromatina, bem como a atividade gênica da eucromatina. A matriz nuclear teria a função de ancorar as alças cromatínicas, as enzimas envolvidas na replicação e transcrição do DNA e também as proteínas envolvidas no transporte dos RNA.

Dispersos no nucleoplasma também são encontrados proteossomos que, conforme discutido no Capítulo 10, são agregados proteicos envolvidos com a degradação de proteínas. Eles se localizam nas regiões eucromáticas tanto quanto na periferia da heterocromatina e dos nucléolos. Uma das funções dos proteossomos nucleares é a hidrólise das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (Capítulo 9).

Resumo

A informação genética das células está codificada e armazenada, em sua maior parte, no DNA do núcleo. Durante sua vida, a célula passa por dois estágios, sendo um de divisão em duas células-filhas – a mitose – e outro que se intercala entre duas divisões sucessivas – a intérfase. O núcleo, na intérfase, pode apresentar-se sob várias formas, mas, em todas as células eucariontes, ele é separado do citoplasma pelo envoltório nuclear, que é constituído por duas unidades de membrana. Esse envoltório contém poros que regulam o intercâmbio de substâncias entre o núcleo e o citoplasma. Associada à membrana interna do envoltório nuclear existe uma rede fibrilar de proteínas: a lâmina nuclear. A cromatina está associada a essa rede de proteínas. A cromatina engloba todo o DNA nuclear que forma um complexo estável com proteínas básicas: as histonas. A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, que é constituído por 200 pares de bases de DNA associado a um octâmero de histonas. Dois tipos de fibras cromatínicas são encontrados no núcleo interfásico: a fibra de 10 nm, que é formada pela associação linear de nucleossomos, e a fibra de 30 nm, formada pela associação da histona H1 à fibra de 10 nm.

Por esse processo, a enorme quantidade de DNA existente no núcleo das células eucariontes é compactada, podendo assim alojar-se dentro do pequeno volume nuclear. A cromatina ativa constitui a eucromatina, que pode estar condensada ou descondensada, e a cromatina inativa, que está sempre condensada e é chamada heterocromatina. Dois tipos de heterocromatina são descritos. A heterocromatina constitutiva é formada por sequências de DNA altamente repetitivas e está sempre condensada em todas as células de um mesmo organismo. A heterocromatina facultativa não contém DNA repetitivo e, em uma espécie e até no mesmo indivíduo, pode estar condensada em certas células e descondensada em outras. É o caso do cromossomo X das células das fêmeas de mamíferos. A quantidade de DNA por núcleo, nas células dos seres vivos, mostra um incremento considerável quando se progride na escala evolutiva: quanto mais evoluído é o organismo, maior o teor de DNA de suas células. Há, entretanto, numerosas exceções a essa regra, em parte explicadas pela existência de diversas classes de DNA. As células eucariontes apresentam três frações principais de DNA quando se considera o grau de repetição das sequências de nucleotídios: o DNA de sequência única, o DNA que contém repetições de determinadas sequências em número moderado e o DNA composto por frações repetidas em um grau muito elevado. Além dessa repetição de sequências, o número de cópias de algumas sequências específicas pode, durante a vida do organismo, ser aumentado, independentemente das demais sequências, por um processo denominado de amplificação. A região organizadora do nucléolo, ou seja, a porção do DNA que contém os genes que codificam os RNA ribossômicos, também pode sofrer amplificação em algumas espécies. Os nucléolos são organelas esféricas intranucleares não envolvidas por membrana. São compostos por numerosas proteínas, pela porção do DNA que contém os genes que codificam os RNA ribossômicos e pelos RNA ribossômicos. Os nucléolos participam da transcrição dos RNA ribossômicos e da montagem das subunidades ribossômicas, além da complexação de outras moléculas de RNA com proteínas, como a montagem da telomerase e das partículas reconhecedoras do sinal.

Cromossomo metafásico: o estado mais condensado da cromatina

Os cromossomos são resultantes da condensação da cromatina que ocorre durante a divisão mitótica ou durante a meiose. O grau de condensação é máximo na metáfase, razão pela qual os estudos da estrutura cromossômica utilizam cromossomos metafásicos.

Estrutura dos cromossomos metafásicos

A duplicação do DNA é condição determinante para que a célula entre em divisão. Em consequência, o cromossomo metafásico é composto por duas moléculas de DNA, cada qual presente em uma das duas cromátides que constituem o cromossomo. Cada cromátide é resultante da compactação da fibra cromatínica de 30 nm que, segundo o organismo, apresenta diâmetro entre 0,25 e 2 μm e comprimento de 0,25 a 30 μm (Figura 8.20).

A estrutura dos cromossomos metafásicos foi demonstrada em experimentos nos quais esses cromossomos foram tratados com substâncias polianiônicas, tais como heparina ou sulfato de dextrana. Esses poliânions removem as histonas ligadas ao DNA. A estrutura resultante mantém a morfologia original do cromossomo em um esqueleto central, denominado esqueleto metafásico. Um halo formado por muitas alças de DNA não associado a histonas, as quais se ligam em pontos adjacentes do esqueleto, circunda, o esqueleto metafásico. Por eletroforese, determinou-se que o esqueleto central é constituído por mais de 30 proteínas acídicas diferentes. Esse experimento sugere que o cromossomo metafásico seja formado por um esqueleto central de proteínas não histônicas, ao qual a fibra cromatínica de 30 nm se associa como alças. As sequências de DNA que se associam ao esqueleto foram denominadas SAR (do inglês *scaffold attachment regions*), ou regiões de ligação ao esqueleto, e correspondem às MAR descritas para a cromatina interfásica. Embora a matriz nuclear e o esqueleto metafásico sejam constituídos por proteínas diferentes, eles apresentam alguns componentes em comum, como é o caso da topoisomerase II.

Foi isolada e caracterizada bioquímicamente uma família de proteínas envolvida com a organização estrutural dos cromossomos, chamada SMC (do inglês *structural maintenance chromosomes*). Pertencem a essa família dois grandes complexos de proteínas: o complexo condensina e o complexo coesina, relacionados, respectivamente, com a condensação do cromossomo e com a manutenção da união entre as cromátides-irmãs de um cromossomo (Figura 8.21). As proteínas dos dois complexos apresentam as mesmas características estruturais. Elas são moléculas longas, que se associam em dímeros por meio das suas porções helicoidais e apresentam domínios globulares em ambas as extremidades. Na região central helicoidal das moléculas ocorre um dobramento, enquanto as extremidades globulares, que possuem atividade ATPásica, ligam-se ao DNA (Figura 8.21).

Com a participação das proteínas do complexo coesina, as duas cromátides de um cromossomo se unem por meio de uma região de estrangulamento, denominada constrição primária ou centrômero. Nessa região, a cromatina está bastante condensada e as sequências de DNA são altamente repetitivas (DNA satélite). Em geral, cada cromossomo contém apenas um centrômero e a posição deste permite a classificação morfológica dos cromossomos (Figura 8.22). Os cromossomos metacêntricos apresentam centrômero central, dividindo o cromossomo em dois braços com tamanhos iguais. Os cromossomos com braços de tamanhos desiguais são chamados submetacêntricos. Cromossomos acrocêntricos apresentam centrômero subterminal, deslocado para uma das extremidades. Os cromossomos telocêntricos apresentam centrômero terminal.

2 nm

10 nm

30 nm

300 nm

700 nm

1.400 nm

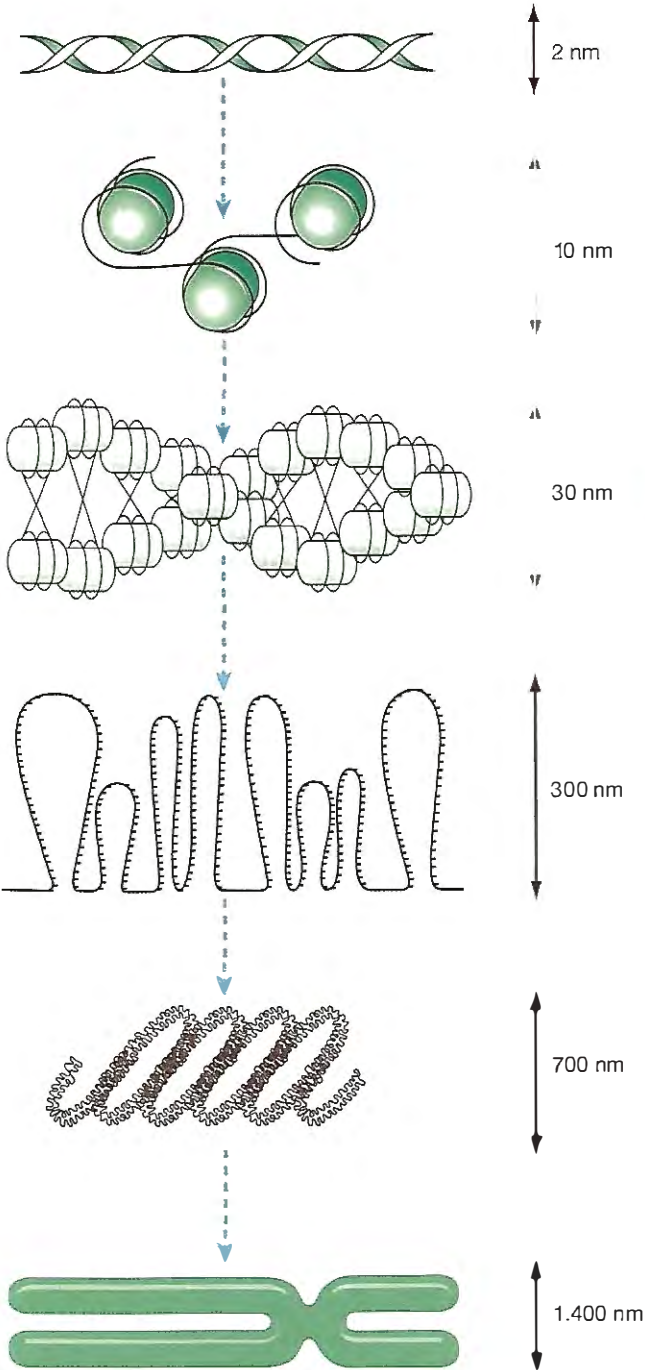



Figura 8.20 ▪ Desenhos esquemáticos que mostram os diversos graus de compactação da cromatina. *De cima para baixo*, aparece primeiro a dupla hélice do DNA (2 nm); depois, a associação com histonas, formando as fibras de 10 nm ou nucleofilamentos. A essas fibras se associam as moléculas de histona H1, constituindo as fibras de 30 nm, que, depois, formam alças de 300 nm. As alças se enovelam, formando estruturas bastante compactadas, com 700 nm. Finalmente, no último desenho, o cromossomo metafásico, o grau máximo de condensação da cromatina.

Figura 8.21 ▪ Em **A**, está representada a estrutura de um dímero de moléculas de coesina ou de condensina, pois ambas apresentam a mesma estrutura. Essas moléculas apresentam uma região helicoidal central, pelas quais se associam, e dois domínios globulares em cada extremidade, que são responsáveis pela associação com o DNA e com o ATP. O dímero se dobra na região central, estabelecendo um "cotovelo". Em **B**, são mostrados dímeros de condensina associados a uma fibra de cromatina, que compacta a fibra e auxilia na formação do cromossomo. Em **C**, estão esquematizadas moléculas de coesinas que se ligam, na altura do centrômero, às duas cromátides do cromossomo, mantendo essas cromátides unidas.

Cada cromátide apresenta uma estrutura proteica associada lateralmente ao centrômero: o cinetócoro. Na maioria dos organismos, essa estrutura tem forma de disco, com 0,3 μm de diâmetro e 0,1 μm de espessura. Em cortes ultrafinos, o cinetócoro aparece constituído por três discos empilhados. O disco mais interno contata com o centrômero, enquanto no mais externo se ligam os microtúbulos que compõem o fuso de divisão. Os cinetócoros dirigem a migração dos cromossomos durante a divisão celular (Capítulo 9).

Figura 8.22 ▪ Esquema dos quatro diferentes tipos de cromossomos, classificados de acordo com a posição do centrômero.

Além da constrição primária ou centrômero, determinados cromossomos apresentam estreitamentos que aparecem sempre no mesmo lugar, as chamadas constrições secundárias, muito utilizadas na caracterização dos cromossomos. A região organizadora do nucléolo está presente na constrição secundária de alguns cromossomos; assim, pode-se observar que, frequentemente, os nucléolos se encontram associados às constrições secundárias desses cromossomos (Figura 8.23).

Nas extremidades do cromossomo metafásico são encontradas sequências especiais de DNA, que constituem os telômeros (do grego *telos*, fim). Os telômeros impedem a adesão dos cromossomos entre si, mantendo assim sua estabilidade. Essas sequências foram bastante conservadas durante a evolução: são semelhantes em organismos tão diversos quanto protozoários, fungos, vegetais e mamíferos. Elas consistem em curtas sequências repetidas que se organizam *in tandem* e contêm um bloco de nucleotídios de guanina. Em células humanas, essa sequência é TTAGGG. As sequências teloméricas são replicadas por uma enzima específica: a telomerase. Em função de suas características particulares, essa enzima é capaz de manter constante o tamanho e as propriedades do telômero. Em células cuja telomerase é alterada, os telômeros se modificam e encurtam. Esses sinais estão presentes em células transformadas ou em processo de envelhecimento.

Outro tipo de caracterização dos cromossomos é feito por técnicas especiais de tratamento e coloração, que levam ao surgimento de um padrão definido de segmentos ou bandas diferencialmente coradas ao longo do cromossomo (Figura 8.24). As bandas podem evidenciar diferenças na distribuição de componentes da cromatina ou, ainda, na composição química da cromatina, que ocorrem ao longo do cromossomo. Há diversas técnicas de bandeamento, baseadas em princípios diferentes, mas, quando se utiliza uma determinada técnica, o padrão, o número e a posição de cada banda são específicos e constantes para cada cromossomo. Essa especificidade permitiu identificar de maneira precisa os cromossomos, melhorando sensivelmente a análise do cariótipo. Na maioria das técnicas de bandeamento, inicialmente o DNA é parcialmente desnaturado e, em seguida, corado. As técnicas de bandeamento são diversas, como, por exemplo, a de banda C (material é desnaturado, renaturado e corado com Giemsa), a de banda G (material é tratado com tripsina e corado com Giemsa) (Figura 8.24) e a de banda Q (que utiliza o corante fluorescente quinacrina).

Figura 8.23 ▪ Fotomicrografia de preparado total de cromossomos politênicos do inseto díptero *Telmatoscopus* sp. Nesse tipo de cromossomo é bastante evidente a associação dos nucléolos com as constrições secundárias, nas quais estão presentes as regiões organizadoras do nucléolo. Nu = nucléolos. Coloração orceína lactoacética. (Cortesia de J.M. Amabis e L.C. Simões.)

O complemento cromossômico de uma espécie é constante

Toda espécie animal e vegetal tem um complemento cromossômico característico, o qual se denomina cariótipo. O cariótipo é o conjunto de características constantes dos cromossomos da espécie, quanto a número, tamanho e morfologia. O estudo morfológico dos cromossomos metafásicos de um indivíduo pode ser realizado em células submetidas a um tratamento com colchicina, um alcaloide que impede a polimerização dos microtúbulos do fuso durante a divisão. Assim, a divisão é interrompida na metáfase, quando a compactação dos cromossomos é máxima. Na representação do cariótipo, denominada ideograma, os cromossomos são ordenados aos pares (Figura 8.25).

Nas células somáticas dos eucariontes, os cromossomos ocorrem aos pares, sendo um cromossomo do par de origem paterna e o outro de origem materna. Cada cromossomo de um par é homólogo ao outro, ou seja, eles apresentam o mesmo tamanho, a mesma morfologia e a mesma sequência gênica.

O número de cromossomos de uma espécie é constante e mantido durante os ciclos de divisão pelos quais a célula passa. Apenas durante a meiose, quando se formam os gametas, ocorre a redução à metade no número de cromossomos da célula. Em consequência, os gametas são haploides, isto é, apresentam n

Figura 8.24 ▪ Cromossomos metafásicos humanos tratados pela técnica de bandas G, obtidas por tratamento pela tripsina e posterior coloração com Giemsa. Cada cromossomo tem um bandeamento característico que pemite sua identificação. 2.000×. (Cortesia de A. Wajntal.)

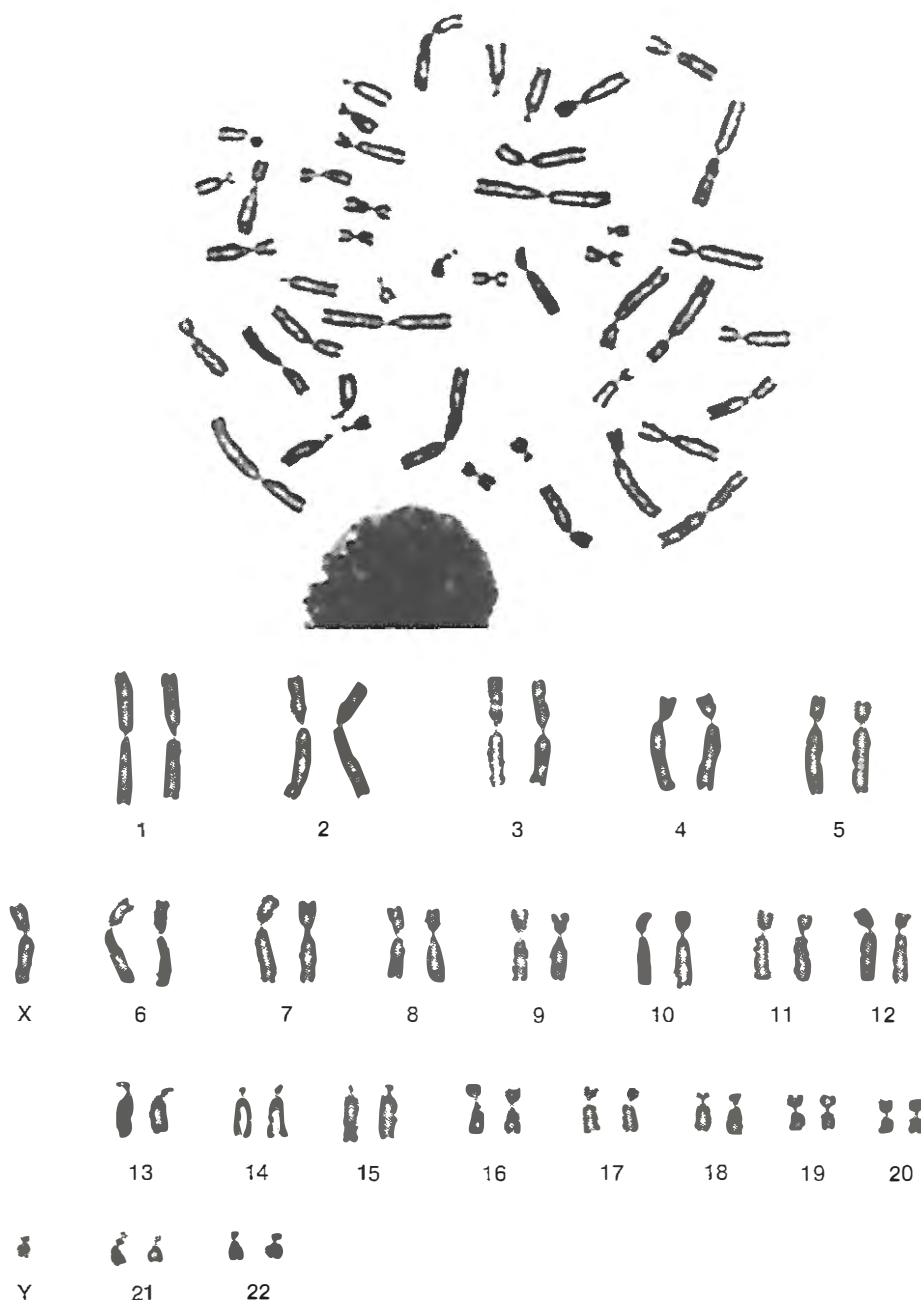



Figura 8.25 ▪ Cariótipo humano. *Em cima*, o aspecto de uma metáfase como é observada em lâminas. *Embaixo*, o ideograma, no qual os cromossomos são ordenados aos pares, de acordo com sua morfologia e seu tamanho. (Cortesia de G. Gimenez-Martin.)

cromossomos. As células somáticas são diploides, ou seja, contêm 2n cromossomos. O número diploide de cromossomos varia muito entre as espécies, indo desde 2n = 2 na lombriga intestinal do cavalo – *Ascaris megalocefala*, variedade *univalentes* –, sendo 2n = 46 na espécie humana (Tabela 8.1) e chegando até mais de 1.000 em certos protozoários.

Cromossomos gigantes: politênicos e plumosos

Nas células de alguns organismos são encontrados cromossomos gigantes, que podem ser observados tanto ao microscópio de luz quanto ao eletrônico. São os cromossomos politênicos, encontrados em células de larvas de insetos dípteros, e os cromossomos plumosos, encontrados em ovócitos de anfíbios.

Os cromossomos politênicos são interfásicos

Vários gêneros de dípteros apresentam, em sua fase larvária, alguns tecidos que contêm cromossomos politênicos em seus núcleos interfásicos. Eles são encontrados em diferentes tecidos, como túbulos de Malpighi, glândulas salivares (Figura 8.26), trato digestivo, músculos, entre outros. Desses tecidos, são as glândulas salivares os que apresentam cromossomos mais desenvolvidos, sendo, por isso, os mais estudados. Esses cromossomos são excepcionalmente grandes, podendo atingir de 150 a 250 mm de comprimento. Seu conteúdo em DNA é muito alto, podendo ultrapassar mil vezes o conteúdo do cromossomo normal do mesmo animal. Cada cromossomo é formado por um grande número de filamentos parale-

Tabela 8.1 ▪ Número de cromossomos nas células diploides de algumas espécies animais e vegetais.

Nomes científico e vulgar	Nº de cromossomos (2n)
Ascaris megalocefala var. univalentes (lombriga de cavalo)	2
Culex pipiens (mosquito)	6
Drosophila melanogaster (mosca-de-frutas)	8
Didelphis paraguayensis (gambá ou timbu)	22
Rattus rattus (rato)	42
Macaca mulatta (macaco)	42
Homo sapiens (homem)	46
Gorilla gorilla (gorila)	48
Capra hircus (cabra)	60
Equus caballus (cavalo)	66
Columba livia (pomba)	80
Cucumis sativus (pepino)	14
Carica papaya (mamão)	18
Solanum lycopersicum (tomate)	24
Avena sativa (aveia)	42
Solanum tuberosum (batata)	48
Gossypium hirsutum (algodão)	52
Saccharum officinarum (cana-de-açúcar)	80

los, daí o nome de politênicos (*polis* = muito; *tainia* = fio, fita). Na formação dos cromossomos politênicos, os cromossomos homólogos pareiam longitudinalmente e, em seguida, duplicam repetidamente, sem ocorrer, no entanto, a separação dos filamentos duplicados.

Os filamentos cromossômicos apresentam regiões de maior compactação alternadas com regiões menos compactadas ao longo de seu comprimento. As regiões mais compactadas constituem os cromômeros e as menos compactadas são ditas intercromoméricas. Quando o par de homólogos pareia, esse pareamento ocorre cromômero a cromômero, originando, no cromossomo, um padrão de faixas transversais, escuras e claras, que se alternam. Quando ocorre a politenização, ou seja, as várias replicações de cada cromátide, as faixas escuras e claras ficam em sequência, estabelecendo, respectivamente, o padrão de bandas e interbandas (Figura 8.27), característico dos cromossomos politênicos. Admite-se que 95% do DNA estejam nas bandas e apenas 5% nas interbandas.

O tamanho e a disposição das bandas são característicos e constantes para cada cromossomo. Além disso, a disposição dessas bandas em um determinado cromossomo é a mesma em diferentes tecidos. A utilização de técnicas citogenéticas permitiu localizar algumas bandas com muitos genes, ao lado de outras que pareciam não conter genes capazes de se expressar.

A análise dos cromossomos politênicos durante o desenvolvimento da larva mostrou que, periodicamente, algumas bandas sofrem desespiralização do DNA e ficam mais facilmente visíveis no microscópio, formando os pufes. Cada pufe é constituído por numerosas alças dos nucleofilamentos ou cromátides, resultantes da desespiralização do DNA encontrado em uma banda. O estudo radioautográfico demonstrou que, nos pufes, ocorre um aumento na síntese de RNA, razão pela qual se coram mais intensamente e são mais facilmente visíveis (Figura 8.28). O surgimento dos pufes apresenta um padrão específico em cada tecido, aparecendo cada um com uma cronologia própria. Pode-se demonstrar, também, que determinados pufes estão relacionados com a produção de determinados tipos de secreção das glândulas salivares. Assim, os pufes ricos em RNA são a manifestação morfológica da atividade de transcrição dos seus genes, ou seja, correspondem à intensa produção de RNA mensageiros específicos. Outros pufes, menos frequentes, apresentam alta síntese e teor ele-

Figura 8.26 ▪ Fotomicrografia de cromossomos politênicos de núcleo interfásico das glândulas salivares do inseto díptero *Rhynchosciara angelae*. Apesar de ser um núcleo interfásico, os cromossomos são bem visíveis em razão da politenia. Cada cromossomo é constituído por inúmeras faixas claras e escuras alternadas. Coloração pela orceína lactoacética. 1.200×. (Cortesia de J.M. Amabis.)

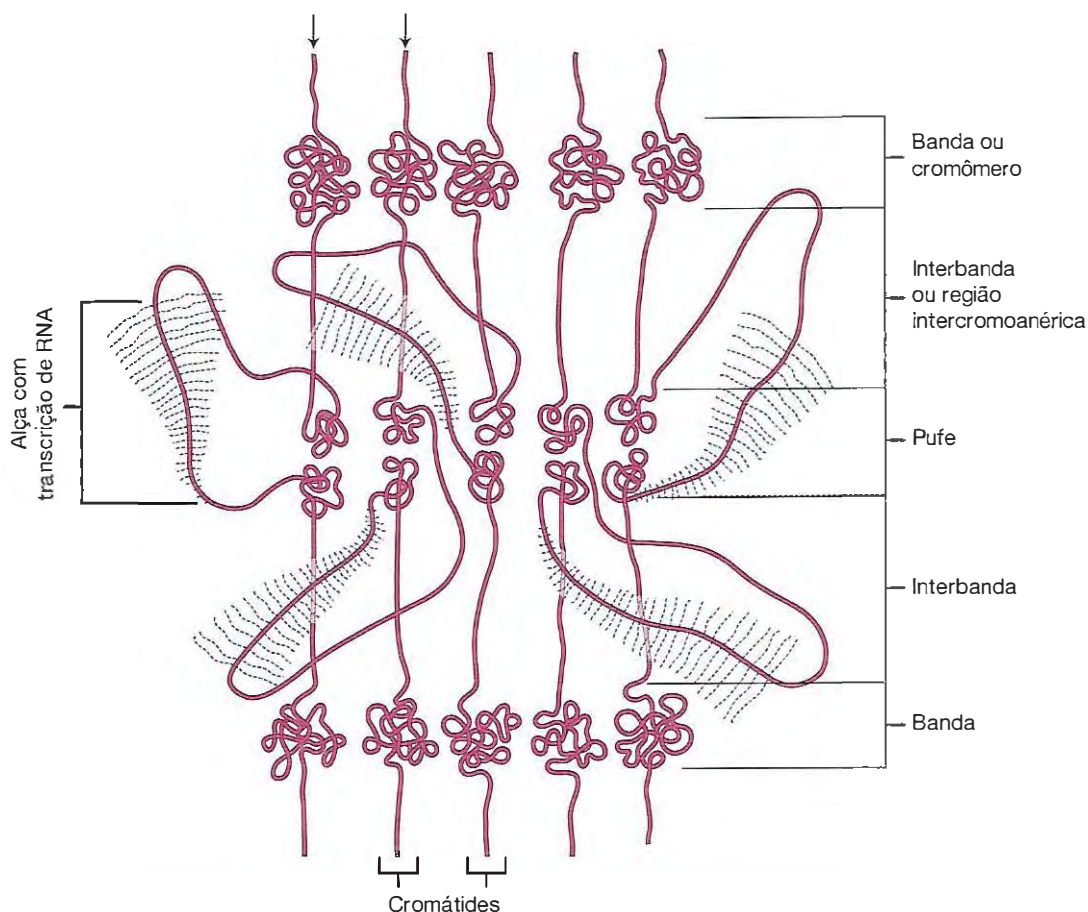



Figura 8.27 ▪ Desenho esquemático que mostra a estrutura de um cromossomo politênico com um pufe. As faixas escuras representam a coincidência das regiões em que os filamentos de DNA se condensam mais, ou seja, dos cromômeros, inexistentes nas faixas claras. O pufe representa uma estrutura cujos filamentos dos cromômeros se desenrolam, formando alças.

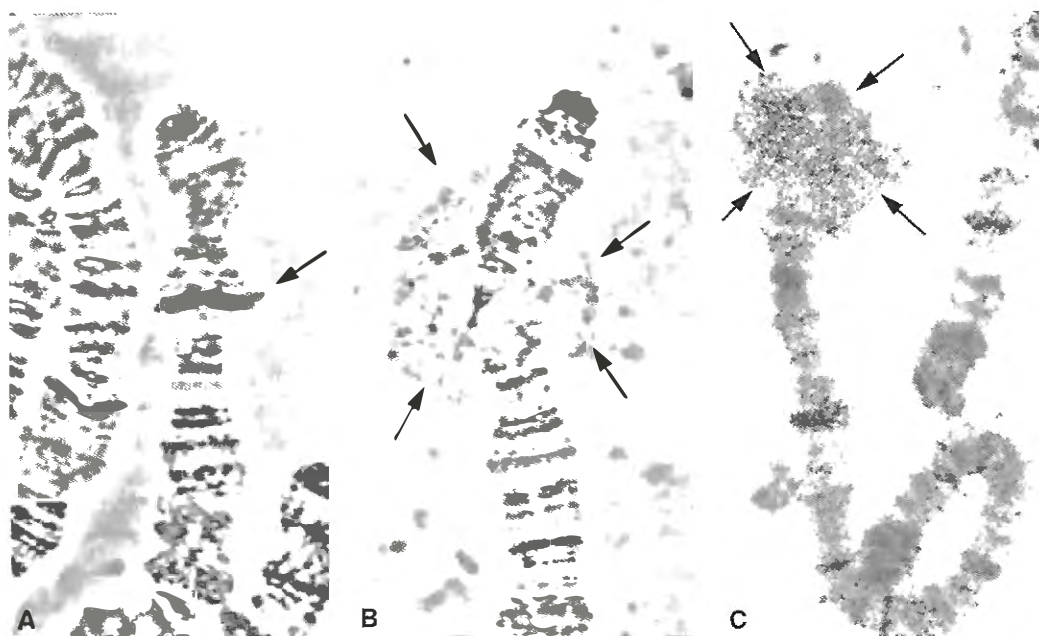



Figura 8.28 ▪ Fotomicrografia de cromossomos de *Rhynchosciara angelae*. Em **B**, um pufe de DNA em fase de expansão na extremidade do cromossomo (*setas*). Em **A**, a mesma região após a regressão do pufe. Nota-se que a faixa correspondente ao pufe (*seta*) está maior que as faixas adjacentes. Isso ocorre em razão da síntese adicional e localizada de DNA que ocorreu no pufe (amplificação gênica). **A** e **B** corados pela orceína lactoacética. 1.200×. (De J.M. Amabis e L.C.G. Simões. *Genética*, **42**:404, 1971. Reprodução autorizada.) Em **C**, radioautografia de cromossomo de animal injetado previamente com uridina H^3. Observe o acúmulo de grãos de prata na região de um pufe de RNA (*setas*), indicando intensa síntese desse composto. O mesmo seria observado em pufe de DNA se fosse injetada timidina H^3 no animal. 1.200×. (Cortesia de D.C. Amabis.)

vado de DNA, processo este que precede uma onda de síntese de RNA. Esses pufes são atualmente considerados resultantes de um processo de ativa replicação gênica localizada, com a provável finalidade de amplificar especificamente certos genes, permitindo a sua expressão de maneira mais ampla. Trata-se, portanto, do equivalente morfológico de um processo de amplificação gênica.

Como já foi elucidado, o ritmo de formação e desaparecimento dos pufes é específico para cada tecido. Recentemente, descobriram-se vários fatores capazes de alterar esse ritmo, acelerando ou retardando o aparecimento dos pufes. Os fatores que apresentam esse efeito são de natureza variada, e estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostram que simples modificações da dieta (como a adição da galactose), da temperatura (choque térmico) ou da composição salina do meio podem alterar o ritmo de aparecimento dos pufes. Sem dúvida, o fator que mais chamou atenção até o momento é o hormônio da muda dos insetos, chamado ecdisona. Esse hormônio é produzido na glândula prototorácica dos dípteros e participa no controle do ciclo das larvas e formação da pupa nesses insetos. A injeção desse hormônio em larvas jovens desencadeia o aparecimento de pufes que, normalmente, só apareceriam mais tarde, no momento da pupação, época em que atua a ecdisona produzida pela própria larva. Evidentemente, trata-se de um exemplo em que é possível observar o equivalente morfológico da ativação de genes por um hormônio.

Calcula-se que apenas 10 a 15% do DNA dos cromossomos politênicos se expressem ao mesmo tempo nos pufes, estando o restante do genoma inativo. Os vários genes transcritos estão envolvidos com a síntese de enzimas digestivas, enzimas e proteínas que participam na pupação e síntese de proteínas estruturais.

Em resumo, os cromossomos politênicos permitem o estudo acurado da transcrição não só dos pontos de vista qualitativo (quais os genes em atividade) e quantitativo (quantos genes estão em atividade), como também cinético (em que época aparecem os pufes, a sua duração e a época de regressão).

Os cromossomos plumosos são meióticos

Esses cromossomos (Figuras 8.29 e 8.30) se formam na prófase da meiose dos ovócitos de determinados animais, como anfíbios, alguns peixes e répteis, sendo mais estudados nos anfíbios por se tratar de material de fácil manuseio. Os cromossomos plumosos podem atingir até 1,5 mm de comprimento. Eles se formam na prófase da meiose, especificamente no diplóteno, quando os homólogos pareados estão se repelindo, mas ainda estão unidos pelos quiasmas (mais detalhes no Capítulo 9). Cada cromossomo é constituído por duas cromátides, e, ao longo de cada cromátide, aparecem regiões de maior compactação da fibra, formando os cromômeros, que se alternam com regiões de menor compactação, intercromoméricas.

Alguns desses cromômeros se desespiralizam e formam alças; o cromossomo fica com duas alças simétricas, uma de cada lado, oriundas dos cromômeros encontrados em cada uma das cromátides (Figuras 8.29 e 8.30). O conjunto dessas

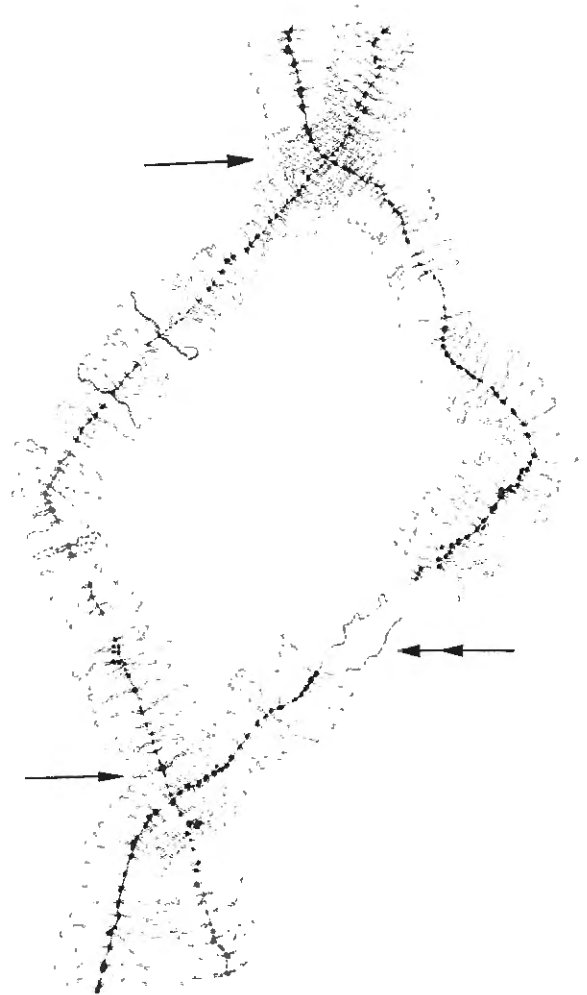



Figura 8.29 ▪ Parte de um par de cromossomos plumosos do urodelo *Triturus viridescens*. Os dois cromossomos estão unidos pelos quiasmas (*setas*). Na região da seta dupla observa-se uma porção do cromossomo onde os dois filamentos estão separados. Esse aspecto demonstra que o cromossomo, nessa fase, é constituído por dois nucleofilamentos (cromátides). (Com base em estudos de J. Gall.)

alças confere aos cromossomos o aspecto de uma pluma ou de uma escova para limpar tubo de ensaio, do que resultou seu nome em português (plumoso) e em inglês (*lampbrush chromosome*), respectivamente.

Estudos histoquimicos e radioautográficos desses cromossomos demonstraram que, na região das alças, ocorre grande síntese e acúmulo de RNA. O tratamento desses cromossomos com RNase elimina o RNA acumulado nas alças, mantendo, porém, a integridade dos filamentos. O tratamento com DNase, por sua vez, não remove o RNA acumulado nas alças, mas fragmenta o filamento cromatínico em diferentes regiões. Admite-se que os genes presentes nas alças desses cromossomos estão sendo ativamente transcritos em RNA. Nesse sentido, seriam homólogos aos pufes dos cromossomos politênicos, só que naqueles há duas alças por cromômero, uma vez que existem apenas duas cromátides em cada cromossomo. Diferentemente dos cromossomos politênicos, no entanto, os plumosos transcrevem durante a prófase da meiose.

O aparecimento dos cromossomos plumosos coincide com a fase em que ocorre intenso crescimento do ovócito, quando material macromolecular deve ser acumulado para, posteriormente, atender às necessidades do embrião durante a fase

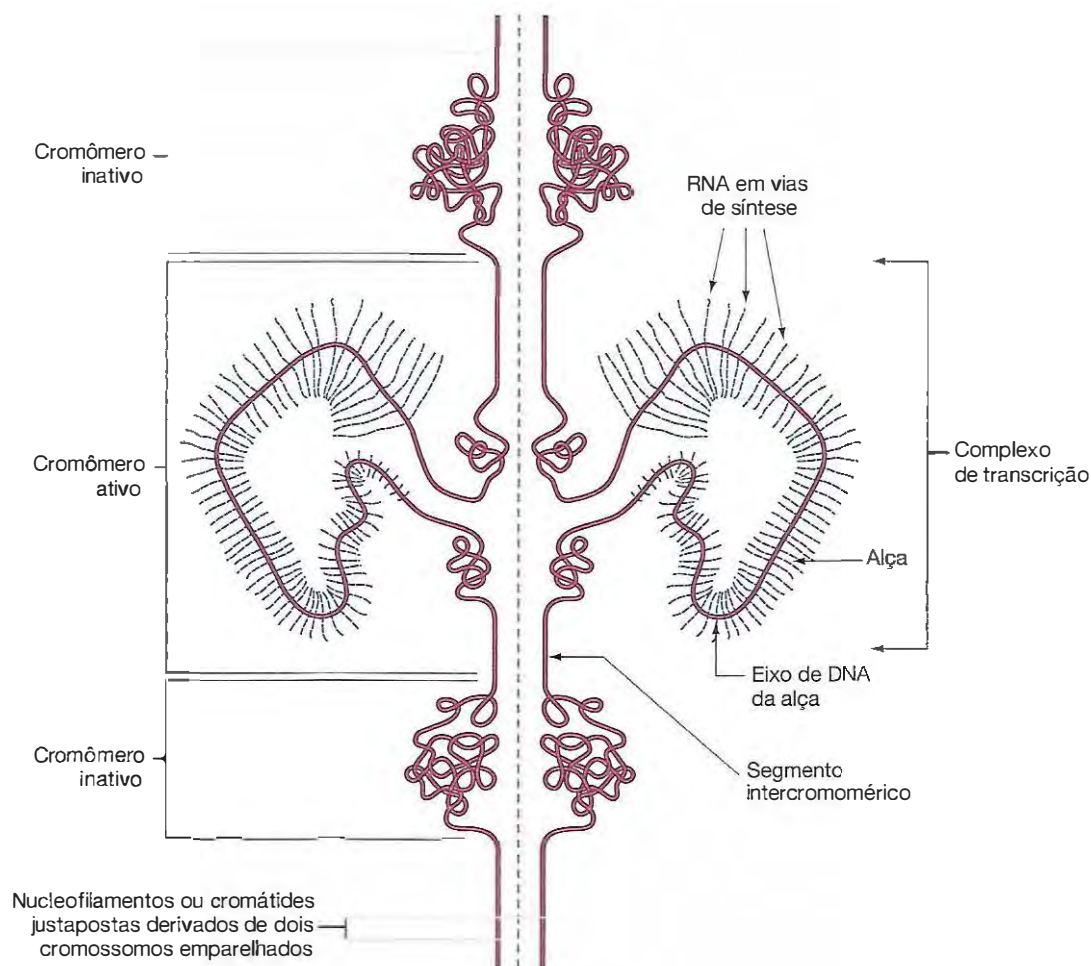



Figura 8.30 ▪ Esquema que ilustra a estrutura de um cromossomo plumoso. Os nucleofilamentos dispostos paralelamente apresentam regiões cromoméricas intercaladas com segmentos intercromoméricos. Alguns cromômeros apresentam parte do seu nucleofilamento desespiralizado e em intensa fase de transcrição de RNA (cromômero ativo). (Redesenhada de Berkaloff *et al. Biologie et Physiologie Cellulaires.* Herman ed., Paris, 1981.)

de segmentação. Os estudos ultraestruturais realizados nesse período sugerem uma intensa transferência, do núcleo para o citoplasma, de RNA ribossômico e RNA mensageiro para a síntese de histonas. Centenas de nucléolos são vistos associados à superfície interna do envoltório nuclear. Cada nucléolo apresenta um anel de DNA que se supõe ser originado por replicação do organizador nucleolar. Essas réplicas circulares migram para a periferia do núcleo e constituem o molde para a síntese do RNA ribossômico. Esse processo representa, portanto, uma considerável amplificação dos locais de síntese de RNA ribossômico.

Depois da prófase meiótica, os cromossomos plumosos voltam à sua morfologia meiótica normal. Nesse sentido, diferenciam-se dos cromossomos politênicos, que são estáveis morfologicamente, apenas desintegrando-se, da mesma maneira que todo o tecido, durante a metamorfose do inseto.

Resumo

Os cromossomos, na grande maioria dos organismos, são visíveis apenas durante a divisão do núcleo, especificamente na metáfase, etapa do ciclo celular em que estão altamente condensados. O cromossomo metafásico é formado por um esqueleto de proteínas acídicas, responsável pela condensação da fibra de cromatina, que a ele se liga na forma de solenoide. Cada cromossomo é constituído por duas regiões longitudinais idênticas, chamadas cromátides, que são unidas pela constrição primária ou centrômero. A posição do centrômero define quatro tipos de cromossomos: metacêntrico, submetacêntrico, [illegible]cêntrico e telocêntrico. O número, o tamanho e a morfolo[illegible] dos *cromossomos são constantes para a espécie. Em alguns* [illegible]os, além dos cromossomos metafásicos, na intérfase e na prófase da meiose, são encontrados cromossomos gigantes, denominados, respectivamente, cromossomos politênicos e cromossomos plumosos. Os cromossomos politênicos ocorrem em vários tecidos de alguns organismos; porém, os mais comuns e estudados são aqueles das células das glândulas salivares de insetos dípteros. Esses cromossomos originam-se por um processo de endorreplicação, pelo qual as cromátides replicadas ficam juntas, pareadas, e o cromossomo apresenta, assim, centenas de filamentos. Esses cromossomos apresentam regiões transversais mais compactadas, que se coram intensamente – as faixas ou bandas –, alternadas com regiões menos compactadas, *que se coram menos intensamente – as interfaixas ou interban*das. As bandas originam-se pela justaposição dos cromômeros

homólogos existentes nos inúmeros filamentos que compõem o cromossomo. Essas bandas podem sofrer, em épocas específicas da vida do organismo e, também, em diferentes tecidos, uma desespiralização, provocando um intumescimento localizado no cromossomo. Essas estruturas foram denominadas de pufes e são locais nos quais ocorre uma intensa síntese de RNA. Os pufes, com seu padrão cronológico específico, são a manifestação morfológica da atividade gênica diferencial. Os cromossomos plumosos são facilmente reconhecíveis nos ovócitos de anfíbios, graças à sua grande dimensão. Apresentam-se aos pares, pois ocorrem na final da prófase I da meiose, estágio em que o emparelhamento dos cromossomos ainda é visível nas regiões dos quiasmas. Cada cromossomo do par é formado por duas cromátides, pois, nessa fase, os cromossomos estão duplicados. Cada cromátide apresenta regiões compactadas – cromômeros – e regiões descompactadas – as alças. Nas alças ocorre intensa síntese de RNA e, como estão ativas segundo um padrão determinado, representam genes específicos em atividade. Dessa maneira, as alças são o equivalente morfológico dos pufes dos cromossomos politênicos.

Manipulação do DNA: engenharia genética

O termo engenharia genética, no seu sentido mais amplo, envolve uma série de procedimentos para modificar o genoma de um organismo.

O desenvolvimento de técnicas que permitiram a manipulação do DNA revolucionou a biologia molecular. Essas técnicas foram coletivamente chamadas de tecnologia do DNA recombinante. Elas permitem que genes específicos sejam isolados, sequenciados, alterados e introduzidos em células nas quais esses genes não se expressam. Esses procedimentos podem ser aplicados a todos os seres vivos, desde bactérias até o homem. Essas técnicas possibilitam, por exemplo, inserir genes específicos no genoma de bactérias, induzindo-o a produzir, em quantidades comerciais, proteínas específicas e de uso médico, como a insulina e o hormônio de crescimento humano. O genoma de plantas também pode ser modificado, tornando-as mais produtivas e mais resistentes às doenças.

A tecnologia do DNA recombinante depende da utilização de enzimas de restrição, que fazem a clivagem do DNA em regiões específicas, facilitando o isolamento e a manipulação de genes individuais. Enzimas de restrição são endonucleases que funcionam como tesouras moleculares, ou seja, têm a capacidade de reconhecer e de cortar sequências específicas na dupla hélice de DNA. Elas ocorrem em bactérias, das quais são isoladas para uso laboratorial. Já foram isoladas e caracterizadas enzimas de restrição que permitem o reconhecimento de mais de 100 sequências nucleotídicas. Diferentes espécies de bactérias produzem enzimas de restrição com diferentes especificidades, o que possibilita isolar um fragmento de DNA que contém um determinado gene. Esse gene pode, então, ser clonado, ou seja, a partir dele podem ser obtidas cópias em quantidades ilimitadas. Ele também pode ser modificado e introduzido em um genoma de outro organismo.

Dentre as técnicas do DNA recombinante, as mais importantes são as descritas a seguir.

Hibridação de ácidos nucleicos

Torna possível o reconhecimento de sequências complementares de DNA ou RNA. Assim, um determinado fragmento de DNA pode ser localizado em uma mistura heterogênea, desde que se disponha de uma sequência complementar ao fragmento. Essa sequência complementar é chamada de sonda e consiste em sequências de nucleotídios de DNA ou de RNA que foram clonadas ou sintetizadas *in vitro*, utilizando-se nucleotídios marcados com isótopos radioativos. A técnica de hibridação está descrita resumidamente na Figura 8.31. Quando o DNA é submetido a temperaturas de 90 a 100°C, os dois filamentos de polinucleotídios desnaturam, ou seja, eles se separam. Se esses filamentos desnaturados são incubados em condições apropriadas de temperatura (em torno de 65°C), eles renaturam, ou seja, as bases complementares voltam a se dispor em pares, formando-se novamente o duplo filamento. Dessa maneira, formam-se híbridos entre sequências complementares de ácidos nucleicos. Se a sonda radioativa estiver presente no meio de incubação, ocorrerá o pareamento entre a sonda e o fragmento complementar a ela. Esses híbridos podem ser formados entre dois filamentos de DNA, dois filamentos de RNA ou um filamento de DNA e um de RNA. Essa técnica é de grande utilidade em biologia, pois, entre outras aplicações, torna possível se determinar quantitativamente, por método bioquímico, a homologia (semelhança) existente entre o DNA de espécies diferentes. Nos vertebrados, por exemplo, foi demonstrada a forte hibridação entre o DNA dos antropoides e o do homem (> 90%) e verificou-se que ela decresce à medida que se desce na escala filogenética dos mamíferos aos répteis, anfíbios e peixes. A homologia entre o DNA de peixes e o do homem é de apenas 20%. Esses dados forneceram um sólido apoio bioquímico à teoria da evolução e têm possibilitado uma série de estudos sobre pormenores da evolução dos seres vivos.

A hibridação molecular possibilita também quantificar o número de cópias de um determinado gene existente em uma célula, pois a quantidade de material radioativo hibridado é proporcional ao número de sequências existentes. Por essa técnica foi possível saber que os genes do RNA ribossômico e das histonas estão presentes nas células em cópias múltiplas, ao passo que os genes para colágeno e enzimas digestivas existem apenas em cópia única por célula.

A técnica da hibridação tem também sido muito usada para a localização de segmentos específicos de DNA nos cromossomos, por meio da hibridação *in situ*. Nessa variante, cromossomos dispostos sobre lâmina são submetidos ao calor, com consequente separação das cadeias do DNA. Esses cromossomos são, então, incubados com suas sondas específicas, por um tempo determinado, em condições nas quais ocorre a hibridação. Após a hibridação, lava-se o preparado, retirando-se o excesso de DNA radioativo, e realiza-se, na lâmina, o processo de radioautografia, que indicará, nos cromosso-

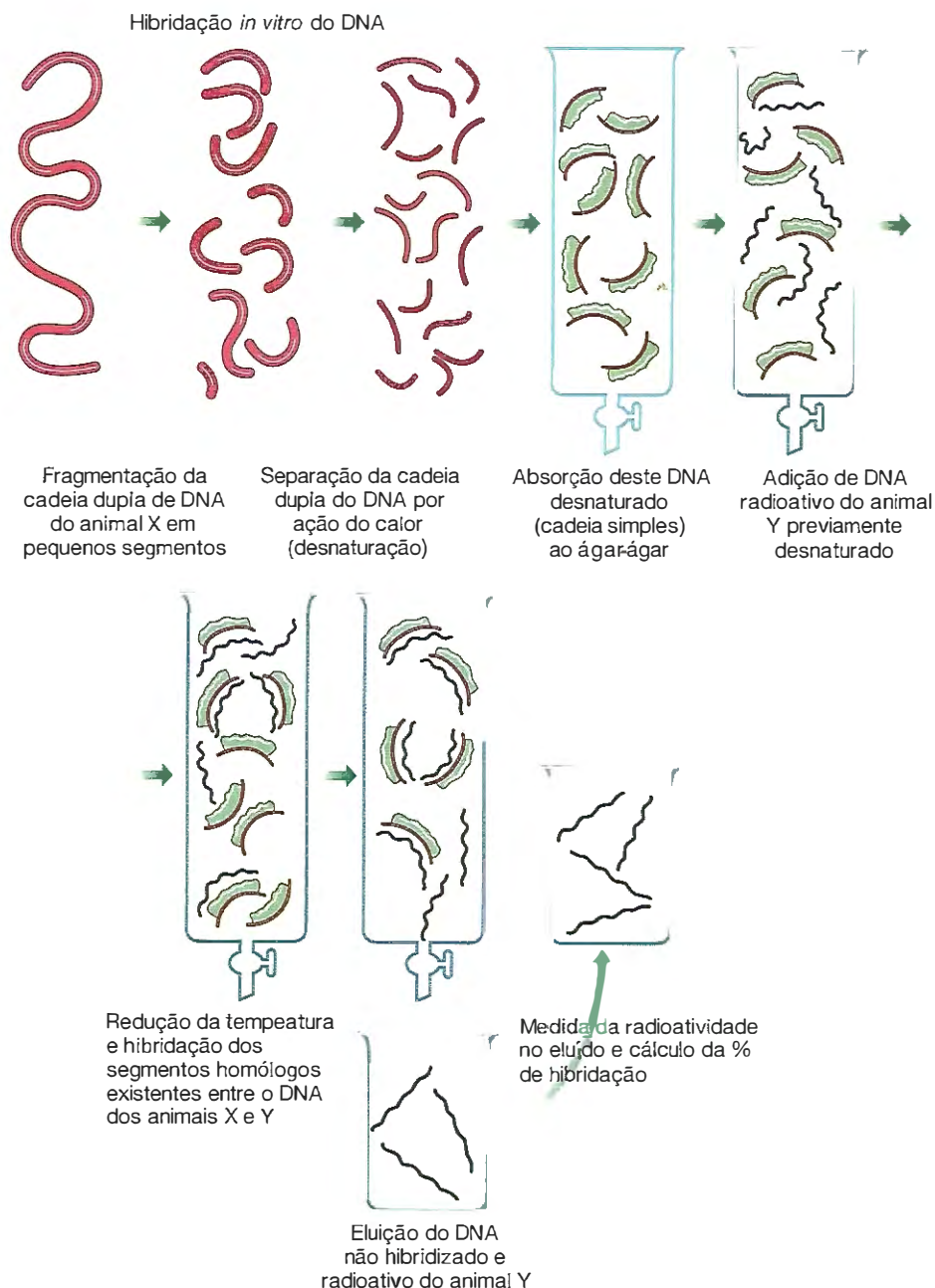



Figura 8.31 ▪ Técnica de hibridação de DNA utilizada em biologia molecular.

mos, onde está localizado o DNA em questão. A hibridação *in situ* pode também ser feita usando-se RNA radioativo, o qual vai associar-se às regiões cromossômicas que apresentam DNA com sequência de bases complementares ao RNA utilizado. Uma variante desta técnica utiliza, em vez de um isótopo radioativo, uma molécula fluorescente ligada ao ácido nucleico, razão pela qual recebe o nome de FISH (do inglês *fluorescent in situ hibridization*) (Figura 8.32).

▪ Clonagem do DNA

Técnica que consiste em inserir um fragmento isolado de DNA em outra molécula de DNA de uma célula hospedeira, que seja capaz de replicação independente. O resultado é uma molécula de DNA recombinante. Se a molécula recombinante replicar em uma célula hospedeira apropriada, podem ser obtidas grandes quantidades da sequência de DNA que foi inserida. Fragmentos de DNA humano, por exemplo, podem ser clonados em bactérias. Assim, a partir de uma única molécula de DNA podem ser copiados muitos bilhões de moléculas idênticas. Além do DNA, podem também ser clonadas moléculas de RNA. Inicialmente, uma molécula de DNA é copiada a partir de um molde de RNA, pela enzima transcriptase reversa. A molécula de DNA obtida é complementar ao RNA molde, sendo denominada cDNA, e, então, pode ser inserida no DNA de uma célula hospedeira. O processo de clonagem está esquematizado na Figura 8.33.

Outra maneira de se obterem grandes quantidades de fragmentos individuais de DNA *in vitro* é pela técnica de reação em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês *polymerase chain reaction*). A PCR só é possível graças à utilização de um tipo de DNA polimerase cuja atividade enzimática é mantida mesmo em temperaturas elevadas. Essa DNA polimerase é extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, que vive em fontes

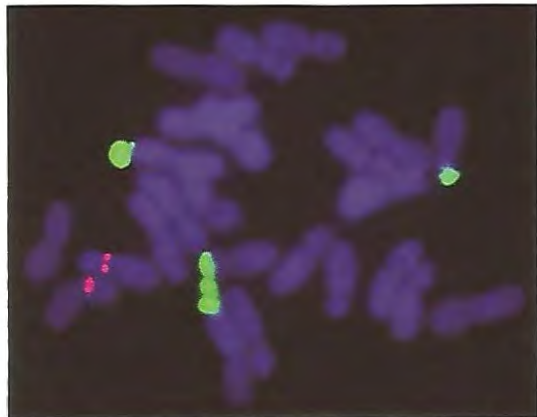



Figura 8.32 ▪ Fotomicrografia de cromossomos metafásicos de *Solanum corymbiflorum* (Solanaceae) com 2n = 24, contracorados com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) (fluorocromo azul) e submetidas à técnica de FISH (*fluorescent in situ hibridization*) para detectar e localizar as sequências de genes de rRNA com sondas obtidas de trigo. O rDNA 45S foi marcado com biotina-14-dATP e detectado com avidina-FITC (fluorocromo verde) e o rDNA 5S foi marcado com digoxigenina-11-dUTP e detectado com antidigoxigenina-rodamina (fluorocromo vermelho). 1000×. (Cortesia de Letícia N. A. Almeida Rego e André L. Laforga Vanzela.)

mRNA
Transcriptase reversa
A
mRNA
DNA complementar
+
B
RNase
DNA complementar – cadeia única
+
C
DNA-polimerase
DNA complementar – cadeia dupla

Bactéria
Cromossomo
Plasmídio
D
Isolamento do plasmídio
E
Ruptura do plasmídio por enzima de restrição

F
Solda do DNA de dupla cadeia sintetizado no DNA do plasmídio = Produção do plasmídio híbrido

G
Integração do plasmídio híbrido na bactéria
H
Multiplicação do plasmídio na bactéria
I
Isolamento dos plasmídios
J
Separação do DNA inserido nos plasmídios
+
Isolamento do plasmídio híbrido
DNA complementar inserido
DNA do plasmídio

Figura 8.33 ▪ Esquema que ilustra resumidamente o procedimento utilizado para a clonagem de um gene em bactéria. Uma molécula de RNA mensageiro serve de molde para a síntese reversa do DNA complementar (**A**), produzindo um híbrido RNA-DNA. A porção de RNA do híbrido é eliminada (**B**), ficando uma cadeia simples de DNA, que é duplicada (**C**). Essa cadeia dupla de DNA é inserida em um plasmídio (**F**) que foi isolado a partir de bactérias previamente infectadas (**D**) e aberto por ação de uma enzima de restrição apropriada (**E**). O plasmídio híbrido resultante é introduzido em bactérias, nas quais se reproduz (**H**). Na etapa seguinte (I), os plasmídios são isolados e as sequências específicas de DNA sintetizadas são deles separadas, graças à ação de enzimas de restrição adequadas (**J**). É possível, em seguida, marcar esse DNA com isótopos radioativos, produzindo, assim, o que se chama de sonda de detecção que, por hibridação, é capaz de quantificar (quando se trabalha *in vivo*) ou localizar a sequência específica de DNA (gene) nas células, quando se faz a hibridação *in situ*.

de água quente, e, por isso, foi denominada Taq-polimerase. A Taq-polimerase é usada para adicionar desoxirribonucleotídios a um pequeno segmento de DNA, ou *primer*, que dirige a síntese do novo segmento de DNA sobre o molde onde o *primer* se ligar.

A PCR pode ser dividida em três etapas fundamentais. (1) A mistura da amostra de DNA + Taq-polimerase + *primers* + os quatro nucleotídios que compõem a molécula de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP) é submetida a uma temperatura de 92 a 94°C, para que ocorra a separação dos dois filamentos do DNA; (2) redução da temperatura para que os *primers* se liguem às extremidades 3′ de cada filamento de DNA, que contêm as sequências nucleotídicas complementares – a Taq-polimerase vai adicionando nucleotídios às extremidades 3′ dos *primers*, copiando os filamentos de DNA e formando filamentos complementares a cada um deles; (3) a temperatura é novamente elevada, fazendo com que os novos filamentos de DNA se separem dos antigos, que foram usados como molde. Ao final, o processo volta a se repetir várias vezes.

Em cada ciclo de repetição, o número de genes (segmentos de DNA) é duplicado, e, como cada ciclo dura 2 a 3 h, em algumas horas o DNA pode ser copiado bilhões de vezes. Além de rápida, a PCR é uma técnica tão sensível que pode amplificar o DNA de uma única célula.

Genes clonados podem ser introduzidos em células animais e mesmo em plantas. Esses experimentos têm possibilitado a identificação de genes que controlam o crescimento e a diferenciação da célula, inclusive dos genes responsáveis pelo desenvolvimento de células cancerosas. Esses genes podem ainda ser introduzidos em células da linhagem germinativa de organismos multicelulares, possibilitando o estudo da sua expressão em organismos. Os animais transgênicos são, geralmente, produzidos por meio da injeção do DNA clonado no pronúcleo do ovo fertilizado, o qual é transplantado posteriormente para uma mãe hospedeira, na qual se desenvolve até o nascimento. Assim, o animal incorporará ao seu genoma um gene estranho, que poderá agora ter sua expressão estudada em um organismo multicelular.

O mesmo processo pode ser empregado para obter as plantas transgênicas, nas quais podem ser inseridos genes que conferem resistência às pragas, ou que aumentam o valor nutritivo de um cereal, por exemplo.

Essa técnica, além de numerosas aplicações em biologia molecular, tem também importância no diagnóstico de diversas doenças hereditárias e em medicina forense. Ela torna possível identificar uma pessoa por meio da comparação de amostras contendo células, mesmo em pequenas quantidades, sejam elas de sangue, esperma ou de um fio de cabelo, sendo por isso usada em exames de perícia policial ou de exclusão de paternidade.

Mutagênese do DNA clonado

Técnica pela qual sequências de DNA clonado são alteradas para produzir versões modificadas de genes, que são reintroduzidos nas células ou em organismos unicelulares. Esse processo de mutagênese *in vitro* pode causar deleções, inserções ou alterações de nucleotídios na molécula de DNA. Esses experimentos favorecem os estudos da expressão gênica, bem como a determinação da função dos produtos desses genes. Por exemplo, alguns aminoácidos de uma determinada proteína podem ser alterados, possibilitando estabelecer a função desempenhada por ela na célula.

Resumo

As modernas técnicas de análise e manipulação genética, associadas a métodos de análise bioquímica de ácidos nucleicos e de proteínas, têm possibilitado que modificações sejam introduzidas nos genomas dos organismos. O conjunto de técnicas com essa finalidade, conhecido como tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética, consiste na introdução de genes de uma espécie em um organismo de outra espécie, de modo que os genes estranhos possam duplicar-se, ser transcritos e traduzidos no novo ambiente celular. A metodologia é complexa e depende do fracionamento do DNA com enzimas de restrição, que cortam a molécula em locais específicos. Ela inclui numerosas técnicas, entre as quais se destacam a hibridação molecular e a clonagem do DNA. As técnicas permitem o isolamento e caracterização de genes específicos que são inseridos em vetores (geralmente plasmídios de bactérias) e transferidos para células procariontes, nas quais, além da produção das sequências de DNA em alto número, o produto final (geralmente proteínas) também é elaborado em altas taxas, podendo até alcançar produção em escala industrial. Esses processos constituem o que se convencionou chamar de clonagem gênica. A aplicação da tecnologia do DNA recombinante tem proporcionado diversas vantagens: desde a determinação da proximidade entre organismos na escala evolutiva, a localização de genes específicos no genoma, com a amplificação daqueles de maior interesse científico, médico ou econômico, até a direta aplicação prática na vida cotidiana, como nos casos de determinação de paternidade.

Bibliografia

Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland, 2002.

Bernstein, E. and Hake, S.B. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol.*, **84**: 505-517, 2006.

Boisvert, FM. *et al.* The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:574-585, 2007.

Crisp, M and Burke, B. The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture. *FEBS Letters*: **582**: 2023-2032, 2008.

Cook, A. *et al.* Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**:647-671, 2007.

D'Angelo, M.A. and Hetzer, M.W. The role of the nuclear envelope in cellular organization. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**: 316-332, 2006.

Farah, S.B. *DNA segredos e mistérios*. Sarvier, 1997.

9 Ciclo Celular e Meiose

Berenice Quinzani Jordão
Celia Guadalupe T. J. Andrade

Roteiro

- Toda célula se origina da divisão de uma célula preexistente
- O período que compreende as modificações ocorridas em uma célula desde a sua formação até sua própria divisão em duas células-filhas é denominado ciclo celular
- O ciclo celular compreende duas etapas: a intérfase e a mitose
- Cada vez que a célula se divide, seu conteúdo deve ser duplicado de modo a reparti-lo igualmente entre as duas células-filhas
- Nos tecidos que se renovam, as células passam pelas fases G_1, S, G_2 e M do ciclo. A fase S é o momento da síntese do DNA
- A síntese de DNA é semiconservativa. Cada dupla hélice tem uma cadeia antiga e uma cadeia nova
- As duas cadeias-filhas de uma molécula de DNA são sintetizadas de maneira diferente: uma contínua e outra descontínua
- A fase M ou mitose é subdividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase
- A progressão por meio do ciclo celular é dirigida por uma família de proteínas
- Uma série de pontos de controle regula a progressão por meio das várias fases do ciclo celular
- Os controles atuam em resposta ao tamanho celular e a sinais extracelulares, como fatores de crescimento e de inibição
- A meiose é a divisão especializada em reduzir à metade o número de cromossomos, resultando na formação dos gametas
- Na meiose ocorre permuta entre cromossomos paternos e maternos
- O controle da meiose é feito por mecanismos semelhantes aos que controlam a mitose
- Os gametas resultantes de um processo meiótico são geneticamente diferentes, o que contribui para maior diversidade da espécie.

A capacidade de crescer e de se reproduzir é atributo fundamental de todas as células. No caso das células eucariontes, o processo básico de gênese de novas células obedece a um padrão cíclico que começa com o crescimento celular, determinado por um aumento quantitativo coordenado dos milhares de tipos diferentes de moléculas que a célula tem, inclusive de seu material genético, e culmina com a partição de seu núcleo e citoplasma em duas células-filhas. As células originadas repetem o ciclo, e o número de células aumenta exponencialmente. Este processo é denominado *ciclo de divisão celular* ou, simplesmente, *ciclo celular*, e serve tanto para manter a vida, em organismos pluricelulares, como para gerar a vida, no caso dos organismos eucariontes unicelulares. Por meio dele, o corpo humano, por exemplo, inicia sua existência a partir de uma única célula, o zigoto, a qual passa por duplicações celulares sucessivas, tanto ao longo do período embrionário como ao longo do desenvolvimento do organismo. Essas duplicações levam à formação de cerca de cem trilhões (10^{14}) de células, chamadas células somáticas, que constituem o indivíduo adulto. Assim, pode-se afirmar que o processo de crescimento de um tecido, de um órgão ou de todo um organismo pluricelular se dá basicamente pela multiplicação do número de suas células, e não pelo crescimento destas, já que uma das propriedades celulares é manter um volume caracteristicamente constante.

Mesmo no adulto, as divisões celulares continuam frequentes. Esse processo de multiplicação ou proliferação celular, que ocorre por duplicação de células preexistentes, é também o responsável pela reposição de células mortas e pela regeneração de partes danificadas de tecidos ou órgãos. As células morrem não só como resultado de lesões, mas, principalmente, por um processo fisiológico normal, conhecido como apoptose, um tipo de morte celular programada, que será discutida mais adiante, neste capítulo. Por esse meio, o organismo controla e mantém constante o número de células em tecidos e órgãos, livra-se de células danificadas e, ainda, elimina células indesejáveis e não permanentes de tecidos em desenvolvimento, durante a morfogênese. Assim, tanto o desenvolvimento como a manutenção de tecidos e órgãos no adulto dependem de um balanço cuidadosamente regulado entre a proliferação celular e a morte programada.

A formação de novas células, no entanto, nem sempre ocorre por meio do ciclo celular típico. Quando se trata da origem de células gaméticas, ou gametas, de organismos que têm reprodução sexuada, esse processo não é cíclico. Os gametas se formam a partir da divisão de células somáticas específicas, presentes nas gônadas ou nos órgãos do sistema reprodutor masculino e feminino, chamadas células germinativas. Os gametas car-[illegible] somente a metade do número cromossô-[illegible]e, assim, a metade da quantidade de mate-[illegible]ético presente nas células somáticas do [illegible] organismo; por isso, são células haploi-[illegible]quanto as somáticas são diploides. Sua [illegible] resulta, portanto, de uma divisão celular [illegible]l, denominada meiose, por meio da qual ocorre redução do conteúdo original de material genético. Assim, a meiose não é simplesmente outro tipo de divisão celular, mas o processo pelo qual uma célula preexistente dá origem a células diferentes dela própria e diferentes entre si. A meiose, então, gera uma fase haploide da vida dos organismos, enquanto a fusão de dois gametas, chamada fecundação ou fertilização, restabelece a fase diploide, por resultar em uma célula diploide, que inicia um novo organismo. A meiose será vista na parte final deste capítulo.

O ciclo celular compreende duas etapas coordenadas: uma de crescimento e outra de divisão em duas células-filhas

O ciclo celular compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células-filhas, todas iguais entre si. O ciclo pode ser dividido em duas grandes etapas:

- aquela compreendida entre duas divisões sucessivas, em que a célula cresce e se prepara para nova divisão, denominada intérfase
- a etapa da divisão propriamente dita, pela qual se originam duas células-filhas. Esta etapa se caracteriza pela divisão do núcleo, chamada cariocinese ou mitose, seguida pela divisão do citoplasma, ou citocinese (Figura 9.1).

O crescimento e a divisão celulares devem ser regulados e coordenados de tal modo que o ciclo transcorra em um equilíbrio que assegure a manutenção das características celulares essenciais na progênie; por exemplo, para que se conserve constante o tamanho celular nas células-filhas, o crescimento deve ser compensado com a divisão celular. Isso significa que a duração do ciclo tem de se ajustar perfeitamente ao tempo de que a célula necessita para dobrar seu tamanho. Assim, evita-se que a célula seja cada vez menor, ou maior, dependendo do tempo de duração do ciclo em relação à massa celular. Essa coordenação requer que mecanismos de controle operem em

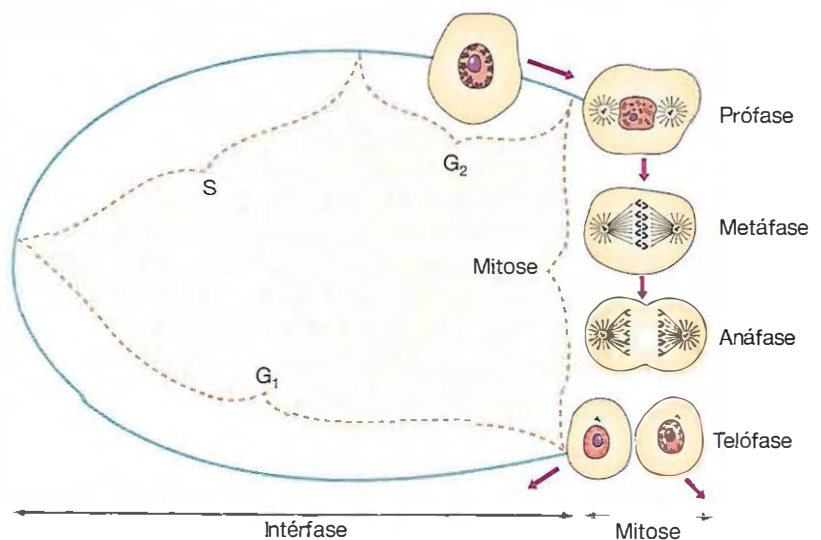



Figura 9.1 ▪ Esquema do ciclo celular. *À esquerda*, a intérfase com as fases G_1, S e G_2; *à direita*, a mitose, dividida em quatro fases. A intérfase consiste em crescimento celular, duplicação do conteúdo e preparação para nova divisão. A mitose compreende a divisão do núcleo e do citoplasma.

momentos específicos do ciclo celular. Nas células eucariontes, o controle do processo de reprodução celular é feito por diversos produtos gênicos, que são, por sua vez, regulados por fatores extracelulares, sejam eles nutrientes ou fatores de crescimento, que fazem com que a divisão celular ocorra coordenadamente com as necessidades do organismo como um todo.

Certamente, a complexidade dos organismos vivos faz com que a maioria dos processos moleculares que neles operam sejam muito diversos, em consequência dos diferentes tipos de vida que têm e dos padrões evolutivos que sofreram. Assim, também os detalhes do ciclo celular variam entre grupos de organismos filogeneticamente distantes. No entanto, quanto mais se conhece a respeito do sistema de controle do ciclo celular, mais similaridades se descobrem entre os diferentes organismos vivos, indicando uma origem ancestral comum e uma alta conservação evolutiva dos modos de atuação e da composição de genes e proteínas envolvidos nesse controle. Essas proteínas são tão semelhantes que muitas delas, quando transferidas de uma célula humana para uma célula de levedura, continuam desempenhando a mesma função.

Figura 9.2 ▪ As quatro fases sucessivas do ciclo de divisão de uma célula eucariótica típica. No início da fase G_1, em resposta a sinais externos, a célula "decide" se continua em ciclo ou se assume um estado quiescente chamado G_0, cuja duração é extremamente variável. Desse estado, ela pode voltar ao ciclo mediante estímulo. Certas células cultivadas, por exemplo, se estimuladas, podem voltar ao ciclo, entrando novamente na fase G_1 e começando a sintetizar DNA 12 h depois. No final de G_1, existe um importante ponto de controle do ciclo, chamado ponto de restrição (R), que impede a progressão do ciclo em condições desfavoráveis ou insatisfatórias. Quando o ponto R é ultrapassado, a célula passa pelas demais fases do ciclo celular até que duas células-filhas idênticas sejam formadas ao final da mitose (M).

▪ Fases do ciclo celular | A síntese de DNA ocorre na fase S da intérfase

Ainda que a mitose constitua morfologicamente a etapa mais espetacular do ciclo celular, é na intérfase que ocorre a duplicação dos componentes da célula-mãe, bem como, em especial, a duplicação do DNA, pré-requisito essencial para que a divisão ocorra. Esse processo pode ser estudado por meio do emprego de precursores radioativos, utilizando-se métodos bioquímicos ou radioautográficos, ou por citofotometria.

Quando precursores radioativos do DNA, como a timidina tritiada (timidina-H^3), são dados às células por poucos minutos e estas são então processadas para radioautografia, pode-se observar, ao microscópio óptico, que células em divisão não incorporam a timidina-H^3. Por outro lado, células que estavam replicando seu DNA no momento da exposição à timidina-H^3 produzem a imagem radioautográfica de núcleos marcados, verificando-se que apenas algumas células em intérfase estavam replicando seu DNA. A observação, a intervalos de tempo fixos posteriores à exposição, para detectar o momento em que o bloco de células marcadas entra em mitose, permite demonstrar, entre outros aspectos, que as células terminam a replicação do DNA pelo menos 2 h antes da mitose. Portanto, nas células eucariontes, a duplicação do DNA está situada em um período intermediário da intérfase e não ocupa toda essa fase. Essa descoberta possibilitou a divisão da intérfase em três períodos sucessivos, ou a divisão do ciclo em quatro fases distintas, que foram chamadas G_1, S, G_2 e M. A sequência cíclica dessas fases está ilustrada nas Figuras 9.1 e 9.2. No período S ocorre a duplicação ou síntese do DNA, daí o nome dessa fase. A abreviatura G provém do termo inglês *gap* (intervalo). O período G_1 é o intervalo de tempo que transcorre desde o fim da mitose (M) até o início da síntese de DNA (S), por isso também considerado período pós-mitótico ou pré-sintético. O período G_2 é o intervalo entre o término da síntese de DNA e a próxima mitose, também denominado período pós-sintético ou pré-mitótico.

As fases do ciclo e a determinação da duração de cada uma delas ainda podem ser estudadas por citofotometria, em que também se mede a quantidade de DNA de células individuais em uma população celular. Para o emprego desse método, células fixadas devem ser coradas com corantes específicos para DNA (por meio da reação de Feulgen, por exemplo) ou com corantes fluorescentes que se ligam a pontos específicos da molécula de DNA. Dessa maneira, na análise feita por meio de um citofotômetro ou da técnica de microfluorometria de fluxo, a fluorescência detectada ou a intensidade de luz transmitida através dos núcleos é proporcional ao conteúdo de DNA. Assim, em uma determinada população celular, podem ser obtidas as frequências de células com conteúdo de DNA duplicado (4C), não duplicado (2C) e intermediário entre 2C e 4C, que corresponderiam, respectivamente, às células nos períodos G_2, G_1 e S. Se as células da população estiverem distribuídas ao acaso pelas diferentes fases do ciclo, ou seja, se a população for assincrônica, então a porcentagem de células detectada em qualquer segmento da intérfase será proporcional à duração desse segmento. Se o tempo médio de ciclo for, também, previamente conhecido, a duração absoluta de cada fase poderá ser determinada; por exemplo, se o tempo de ciclo for de 20 h e 40% da população celular apresentar-se em G_1, conclui-se que a duração dessa fase é de 8 h.

O ciclo celular pode ser estudado, ainda, utilizando-se a técnica de sincronização celular. Esse método permite acompanhar uma população celular que esteja atravessando as etapas do ciclo celular sincronicamente, e, dessa maneira,

podem-se analisar os eventos moleculares inter-relacionados. Para esse fim, pode ser usada uma população celular naturalmente sincrônica. Isso ocorre no fungo *Physarum*, por ser um plasmódio, ou, ainda, no início do desenvolvimento embrionário, quando a sincronia se mantém por cerca de 10 ciclos celulares consecutivos após a fertilização da célula-ovo. Como os casos de sincronia natural do ciclo são pouco frequentes, a sincronização pode também ser induzida. Essa indução pode ser química, usando-se inibidores metabólicos específicos de uma determinada etapa, que, quando retirados, possibilitam a progressão das células no ciclo de maneira sincrônica, ou pode ser obtida mecanicamente; nesse caso, podem-se, por exemplo, separar, dentre células crescendo em frasco de cultura, aquelas que estão em mitose, que se tornam geralmente esféricas e fracamente ligadas ao frasco, daquelas células que estão em intérfase, que se mantêm achatadas e presas à parede do frasco. Diferentemente dos métodos anteriormente mencionados, o de sincronização do ciclo se aplica mais ao estudo dos processos metabólicos que se sucedem e se relacionam em cada etapa do que à determinação dos tempos de duração dessas etapas.

Duração dos períodos do ciclo

A célula tem de crescer até alcançar um tamanho adequado e constante antes de dividir-se. Em função disso, aproximadamente 95% do ciclo são gastos em intérfase, mas o tempo médio total dessa fase é variável de tipo celular para tipo celular. A duração varia também com as condições fisiológicas em que a célula se encontra, como idade celular, disponibilidade de hormônios e de fatores de crescimento, temperatura, pressão osmótica, pressão hidrostática e pressão de oxigênio externas, e mesmo com o ritmo circadiano (ritmo de cerca de um dia) que ocorre nos organismos. Existem também notáveis diferenças quanto à duração do ciclo celular segundo o organismo que se está observando. Em geral, o ciclo dura aproximadamente 12 h em tecidos de mamíferos com crescimento muito rápido, e 24 h, em outros com crescimento mais lento. Por sua vez, em organismos unicelulares, como leveduras, o tempo de geração é bem mais curto, e o período de aproximadamente 1 h e meia é suficiente para a formação de duas novas células.

A fase G_1 é a de duração mais variável na maioria das células de animais e plantas. Na verdade, esse período pode variar individualmente de célula a célula, pois é o que mais sofre influência de fatores extracelulares. Também é o período em que vários inibidores e mutações são capazes de bloquear a proliferação. Em geral, ocupa muitas horas, durante as quais as células crescem. Entretanto, os ciclos de *Amoeba proteus*, *Physarum* sp. e *Tetrahymena* sp. são diferentes, em que a fase G_1 é ausente e a fase G_2 é a mais longa delas. Outro caso em que G_1 é ausente ou tem duração negligenciável é o das células embrionárias iniciais, logo após a fertilização, só que, neste caso, não ocorre crescimento celular. Depois que as células entram na fase S, fatores extracelulares não determinam mais os eventos do ciclo celular, os quais passam a depender de controles disparados de modo intracelular. Portanto, as demais etapas do ciclo, incluindo a mitose, têm tempos de duração mais constantes. A mitose dura mais ou menos 1 h, sendo mais longa em células de tumores e em células transformadas (Capítulo 16); G_2, em geral, tem duração de 2 a 4 h, e esse tempo também aumenta nas células tumorais; o período S dura de 7 a 8 h. Embora essas fases sejam mais constantes, a duração de cada uma delas varia entre espécies e, também, entre diferentes estágios de desenvolvimento de um mesmo organismo. Como exemplo, a fase S tem duração de aproximadamente 10 h, em células maduras de *Drosophila*, e de menos de 4 h em células embrionárias do mesmo organismo.

Em função das variações no tempo de proliferação, as células animais podem ser classificadas em três grandes categorias:

- células que se dividem continuamente
- células que, ordinariamente, não se dividem, mas que podem fazê-lo em resposta a estímulos
- células terminalmente diferenciadas.

No primeiro grupo se incluem as células embrionárias, as células de tecidos de renovação rápida, como as do epitélio que reveste o intestino delgado (as quais se renovam, no homem, de 3 em 3 dias), as dos folículos capilares, as do sistema linfático e as da medula óssea, nas quais se formam as células do sangue. Todos esses tecidos são extremamente sensíveis a agentes ou tratamentos químicos ou físicos (fármacos ou radiações) que afetam a replicação do DNA, razão pela qual são os primeiros a ser lesados nos tratamentos pela quimioterapia do câncer ou na radioterapia em geral (Figura 9.3). Nesse grupo estão também incluídas as células que têm proliferação mais lenta, como as da camada basal da epiderme, as quais, por esse motivo, não manifestam lesões tão rapidamente.

O segundo grupo compreende células que podem permanecer sadias por longos períodos em um estado não proliferante, um estado de dormência ou quiescência com relação ao crescimento, ao qual se denomina período G_0 (G-zero), representado na Figura 9.2. Essas células são desprovidas de fatores de crescimento e, portanto, mantêm um baixo metabolismo, com baixa velocidade de síntese de macromoléculas; apresentam geralmente tamanho reduzido e têm o conteúdo de DNA não duplicado. Desse estado, alguns tipos celulares em G_0 podem entrar na fase proliferativa mediante um estímulo apropriado. Nutrientes, hormônios de crescimento ou um estímulo mecânico, como a lesão provocada por uma intervenção cirúrgica, podem ser estímulos suficientes para que essas células reingressem no ciclo de divisão celular. Nesses casos, o reingresso no ciclo celular sempre se dá na fase G_1, em um momento pouco anterior ao de transição da fase G_1/S, chamado de ponto de restrição (ponto R), que seria um ponto crítico a ser vencido pela célula para que a fase S possa ser iniciada (Figura 9.2). O processo de progressão até a fase S é lento e irreversível; por exemplo, fibroblastos da linhagem 3T3 em cultura requerem pelo menos 12 h para passar de G_0-S, depois de estimulados com a adição de soro ao meio de cultura, enquanto células que estão normalmente em ciclo requerem apenas cerca de 6 h para passar por G_1 e iniciar S. Algumas células que mostram competência para responder a estímulos e reassumir a capacidade de divisão são: hepatócitos, fibroblastos da pele, células renais, células do músculo liso, de pâncreas, de ovário, de pulmão, células endoteliais, células da glândula adrenal e células ósseas.

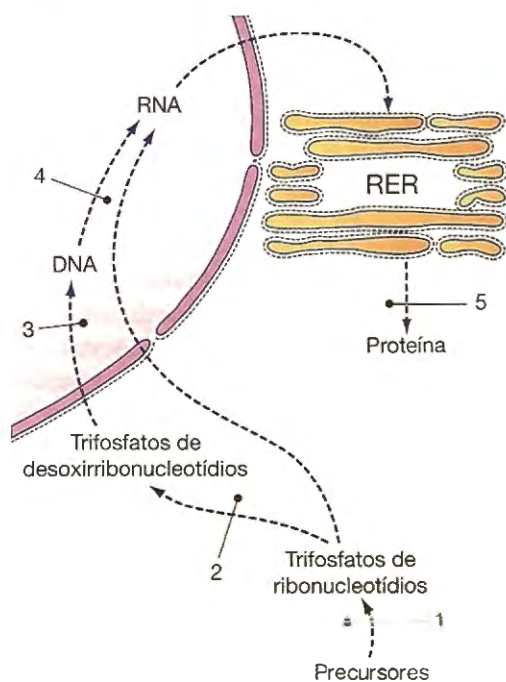



Figura 9.3 ▪ Mecanismo de ação de várias substâncias antimitóticas. *Em cima, à esquerda*, o núcleo celular; *à direita*, o retículo endoplasmático rugoso (RER). As substâncias que inibem a mitose podem agir em várias etapas. A etapa 1 (síntese dos ribonucleotídios) é inibida pela 6-mercaptopurina, uma análoga das purinas, e pela dioxonorleucina e azasserina, que impedem a ação do ácido fólico, necessário à síntese das purinas. Na transformação dos ribonucleotídios em desoxirribonucleotídios (etapa 2), agem como inibidores o arabinosilcitosídeo e a fluoruracila, inibindo enzimas que participam da síntese e polimerização dos trifosfatos de desoxirribonucleotídios. A mitomicina inibe a síntese do DNA (etapa 3), pois se liga fortemente à dupla hélice do DNA, impedindo-a de se abrir para a replicação. Na etapa 4, a síntese de RNA é impedida pela actinomicina D, que se combina com as guaninas do DNA. Nessa mesma etapa age a rifamicina, que inibe a RNA-polimerase. A síntese proteica (etapa 5) é inibida pela puromicina, que compete com os aminoácidos na síntese dos polipeptídios. Com exceção da rifamicina e da puromicina, os outros compostos citados são utilizados na quimioterapia do câncer. (Informações gentilmente cedidas pelo Prof. Ricardo R. Brentani e pelo Dr. Arnaldo Annes da Silva.)

Por último, há tecidos cujas células, ao cessarem suas divisões e se tornarem diferenciadas, perdem permanentemente a capacidade reprodutiva, não podendo ser novamente chamadas ao ciclo. É o caso dos neurônios e das células da musculatura esquelética e cardíaca. Essas células permanecem indefinidamente no período G_0 e são consideradas como terminalmente diferenciadas. No caso de perda celular por lesão, como em um ataque cardíaco, por exemplo, essas células jamais serão naturalmente substituídas por outras células cardíacas.

No entanto, há outras células terminalmente diferenciadas que também não sofrem autoproliferação, mas, por terem vida curta, necessitam ser continuamente substituídas no animal adulto. É o caso das células do epitélio colunar das porções mediana e apical das vilosidades da mucosa do intestino delgado, das células mais superficiais da epiderme e das células sanguíneas, como os eritrócitos anucleados de mamíferos. A substituição dessas células se dá pela proliferação de células indiferenciadas, chamadas células-tronco pluripotentes (em inglês, *stem cells*), que servem naturalmente tanto de fonte de novas células-tronco como de células diferenciadas de vida curta (para mais detalhes, consulte o Capítulo 11). As células-tronco se incluem no primeiro grupo celular descrito.

Eventos bioquímicos da intérfase

Durante muito tempo, como tinha sido detectada na intérfase apenas a replicação do DNA, pensava-se nos outros períodos interfásicos como períodos de repouso celular. Hoje, sabe-se que a intérfase é uma fase de intensa atividade metabólica; nela não só ocorre o crescimento contínuo da célula, mas também operam mecanismos de controle cruciais para o desenvolvimento coordenado dos ciclos de crescimento, replicação e divisão celular.

Enquanto a síntese de DNA é periódica na intérfase, ocupando quase exclusivamente o período S, as sínteses de RNA e de proteínas ocorrem continuamente durante toda a intérfase. A maior taxa de síntese de RNA é detectada em G_1 e no começo de S, quando 80% dos RNA sintetizados são representados pelo RNA ribossômico (rRNA). Por sua vez, os RNA extranucleolares são sintetizados em picos durante os períodos G_1 e G_2. Quanto à síntese de proteínas, embora contínua, resulta em proteínas qualitativamente diferentes que são sintetizadas em quantidades também diferentes a cada período da intérfase. Poucas são as proteínas sintetizadas continuamente em toda a intérfase. Esse é o caso de apenas algumas enzimas e das tubulinas, as quais não aumentam abruptamente em nenhuma etapa específica, já que são recicladas entre o citoesqueleto e as fibras do fuso durante a divisão celular. Também é o caso de uma família de proteínas denominada ciclina (veja adiante), que se acumula continuamente durante a intérfase. A síntese da maioria das enzimas segue um padrão descontínuo, característico de cada enzima, cuja síntese se dá em etapas específicas (aquelas enzimas mais estáveis) ou em picos (as instáveis).

Período G_1

O período G_1 caracteriza-se pelo reinício da síntese de RNA e proteínas, que estava interrompida durante a mitose (período M). Com essas sínteses, a célula cresce continuamente durante essa etapa, como continua fazendo durante S e G_2. Cerca de 80% do RNA sintetizado em G_1 é rRNA. Embora algumas proteínas tenham picos de síntese ao longo de G_1, a maioria delas, do total existente na célula, é sintetizada continuamente durante toda essa fase.

Conquanto seja lógico supor que, nessa fase, a célula esteja se preparando para entrar na fase de duplicação do DNA, os passos dessa preparação não foram especificamente identificados, uma vez que os eventos moleculares de G_1 ainda são pouco conhecidos. Contudo, a síntese de algumas enzimas imprescindíveis para a fase imediatamente subsequente do ciclo, a fase S, como as enzimas catalisadoras da síntese de trifosfatos de desoxirribonucleosídios, enzimas da síntese das DNA-polimerases e enzimas ativadoras dos genes que codificam as proteínas histonas, deve ocorrer nesse período, pois elas aumentam em quantidade no início da fase S.

Grande relevância do período G_1 deve-se ao seu papel controlador de uma importante decisão celular: continuar proliferando ou retirar-se do ciclo e entrar em um estado quiescente (G_0). Essa decisão é determinada primariamente por sinais extracelulares (fatores de crescimento, no caso de eucariontes superiores, e nutrientes, por exemplo, no caso de leveduras),

que desencadeiam várias respostas intracelularmente. Essas respostas são, por sua vez, monitoradas por controladores internos do ciclo, constituídos por diversos componentes proteicos, que agem induzindo ou impedindo a progressão do ciclo. Embora presentes na célula eucariótica há um bilhão de anos, só recentemente essas proteínas reguladoras estão sendo identificadas e suas funções, desvendadas. Estudos de cinética do ciclo vêm demonstrando que elas atuam em uma série de pontos de controle ao longo do ciclo. Um dos pontos críticos de controle estaria ao final de G_1 e foi detectado inicialmente em leveduras, em que recebeu o nome de *start* (em português, início). Em células animais, este ponto de regulação é chamado de ponto de restrição ou ponto R (Figura 9.2), e seria transposto apenas quando proteínas sintetizadas em G_1 fossem acumuladas até que alcançassem uma quantidade crítica, permitindo então à célula transpor o ponto R e iniciar S. Uma vez que tenha passado pelo ponto R, a célula está comprometida a entrar na fase S e prosseguir até o final do ciclo de divisão, mesmo na ausência de estímulos adicionais. Outro mecanismo de controle que ocorre em G_1 é a interrupção temporária do ciclo nesta fase, induzida pela presença de danos no DNA, para que os mecanismos de reparo operem antes da fase de replicação. Em células de mamíferos, o sinal de parada em G_1 é dado por uma proteína conhecida como p53 (sobre esse assunto, consulte, também, o Capítulo 16), cujos níveis intracelulares aumentam em resposta a eventuais danos no DNA, impedindo que a célula prossiga e replique o DNA danificado. A transmissão desses danos às células-filhas, que pode estar relacionada com a perda de funções da p53, resulta em acúmulo de mutações e instabilidade do genoma, que contribuem para o desenvolvimento de câncer. Em diversos tipos de câncer humano, são observadas mutações da p53, com perda de sua função sinalizadora.

Período S

O início da síntese do DNA marca o início do período S e, na grande maioria dos casos, é um ponto de não retorno do ciclo, que leva necessariamente à divisão celular. Durante o período S, a célula duplica seu conteúdo de DNA (Figura 9.4), elaborando réplicas perfeitas das moléculas de DNA que contém. Esse processo denomina-se replicação. Toda célula eucarionte diploide inicia seu ciclo em G_1 com uma quantidade de DNA igual a *2C*. Durante o período S, essa quantidade duplica, passando de *2C* para *4C*, e assim permanece até a fase do ciclo em que é igualmente repartida para as duas células-filhas, as quais voltam a ter, novamente em G_1, a quantidade *2C* idêntica à da célula de origem (Figura 9.4).

A replicação do DNA em células eucariontes guarda estreito paralelismo com a replicação de células procariontes. Por isso, o mecanismo de duplicação do DNA tem sido estudado, de preferência, nas células mais simples, como a bactéria *Escherichia coli*. No entanto, ainda que os resultados obtidos nessa célula procarionte sejam, na essência, válidos também para as células eucariontes, o processo nos eucariontes é muito mais complexo. Células eucariontes têm um genoma enorme, que deve ser duplicado com alta fidelidade uma única vez a cada ciclo celular, e isso deve ser feito dentro de pouco tempo, nas poucas horas ocupadas pelo período S. Soma-se a isso o

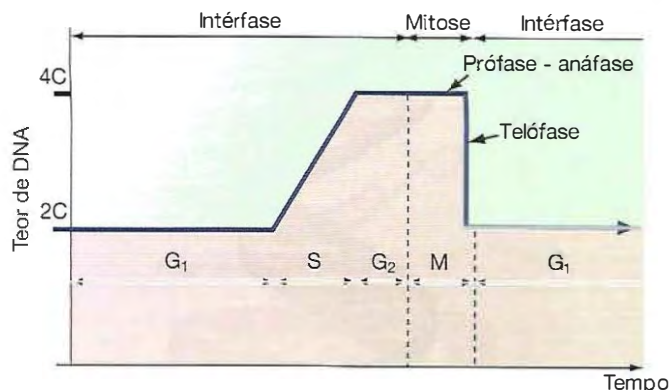



Figura 9.4 ▪ Evolução do teor de DNA (C) no núcleo de uma célula, ao longo do ciclo celular. Na fase S ocorre a duplicação da quantidade de DNA, que permanece assim durante a fase G_2. Apenas na mitose (M) se restabelece o conteúdo inicial.

fato de que, em células eucariontes, o DNA nuclear apresenta-se na forma de fibras de cromatina (descrita no Capítulo 8), formando um complexo com proteínas histonas. Portanto, é a cromatina que deve sofrer duplicação no período S, o que exige que não só o conteúdo de DNA seja duplicado, mas também a quantidade de histonas. Contrariando o que acontece com todas as demais proteínas celulares, as histonas são as únicas proteínas cuja síntese está confinada à fase S, ocorrendo simultaneamente com a síntese de DNA.

É neste período, também, que os primórdios de novos centríolos (chamados pró-centríolos) são observados, formando-se perpendicularmente a cada membro do par de centríolos existente nas células.

A replicação do DNA é semiconservativa

Com base no modelo da molécula de DNA proposto por Watson e Crick, o mecanismo básico de replicação envolve a separação das cadeias de DNA, obtida pelo desenrolamento da dupla hélice, seguido pela cópia de cada cadeia, que serve como um molde para a síntese de uma nova cadeia complementar (Figura 9.5). A sequência de nucleotídios da nova cadeia é fixada pelas regras de pareamento de bases, propostas por Watson e Crick e descritas anteriormente no Capítulo 3. O correto pareamento das bases assegura uma replicação acurada da dupla hélice original.

Durante a replicação, as duas fitas do DNA original, também chamadas de parentais, são copiadas, originando duas moléculas-filhas, cada qual com somente uma das fitas recém-sintetizada. Diz-se, portanto, que a replicação é semiconservativa. Assim, cada nova molécula de DNA é cópia perfeita de uma molécula preexistente.

A replicação semiconservativa do DNA pode ser estudada por radioautografia, utilizando-se timidina-H^3. Ainda pode ser estudada usando-se um análogo estrutural da timidina, a 5'-bromo-desoxiuridina, que se incorpora ao DNA, em substituição àquela base, no momento da replicação. A presença desse análogo na molécula de DNA pode ser detectada pela coloração diferencial das cromátides-irmãs em cromossomos que alcançam a segunda mitose após a incorporação (Figura 9.6).

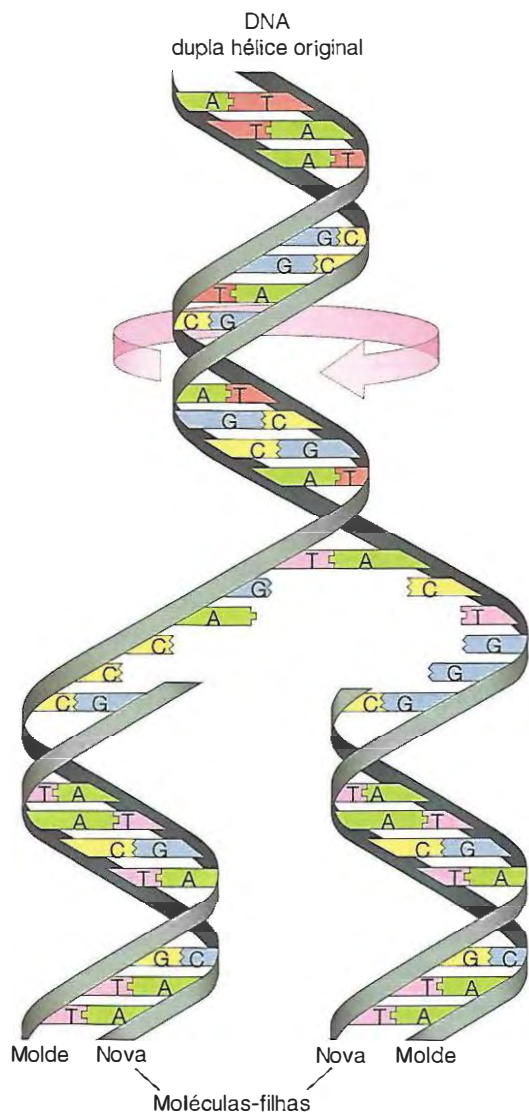



Figura 9.5 ▪ Representação simplificada da replicação semiconservativa do DNA. A dupla hélice de DNA se abre após ser desenrolada. Duas novas cadeias se formam com sequências de nucleotídios complementares a cada uma das cadeias da molécula original de DNA. Por esse mecanismo, uma cadeia serve de molde, ditando a sequência complementar de sua cadeia-filha. Nas duas moléculas que se formam, uma cadeia é parental e a outra é nova. O local da abertura da molécula original de DNA é chamado de forquilha de replicação e está indicado pela seta curta.

Figura 9.6 ▪ Fotomicrografia de cromossomos de células tratadas com bromodesoxiuridina (BrdU) durante uma fase replicativa. Esse composto entra na molécula de DNA, em lugar da timidina, modificando a afinidade tintorial do cromossomo e resultando, na segunda mitose, em cromossomos constituídos por uma cromátide fortemente corada e outra que se cora muito fracamente. Essa coloração diferencial entre as cromátides-irmãs reflete a diferença de incorporação de BrdU entre elas e confirma que a replicação do DNA é semiconservativa. A fotomicrografia mostra, também, trocas entre cromátides-irmãs, que podem ocorrer durante a replicação. (Cortesia de Wolff, S. e Perry, P. Chromosoma, **48**:341, 1974.)

▪ Características gerais da replicação do DNA

▪ *A replicação é assincrônica*

Uma análise detalhada da duplicação do DNA demonstrou que a incorporação de precursores marcados, seja timidina-H^3 ou o análogo da timidina, bromo-desoxiuridina, não se dá ao mesmo tempo em todas as moléculas de DNA de um núcleo e que, dentro de uma mesma molécula, existe um padrão determinado de sequência de síntese; por isso se diz que a duplicação do DNA é assincrônica. Dentro de um dado tipo celular, regiões específicas do material genético, ou genes individuais, começam e terminam sua duplicação em momentos definidos na fase S. A eucromatina, que constitui a cromatina geneticamente ativa, começa a replicar primeiro, fazendo-o desde o início da fase S, enquanto a heterocromatina geralmente é a última a replicar, no final do período S, sendo considerada, portanto, de replicação tardia.

▪ *Existem origens de replicação*

A velocidade de duplicação do DNA é calculada em torno de 30 mm por minuto, na *Escherichia coli*, e de 0,5 a 2,0 mm por minuto (ou o mesmo que 3.000 bases/min), nos núcleos das células eucariontes dos vertebrados. Com essa velocidade, se o processo começasse por um extremo da molécula de DNA e terminasse no outro, o genoma dos vertebrados gastaria um tempo muito longo para sua replicação. Calcula-se que seria necessário 1 mês para um cromossomo humano replicar. Isso realmente não acontece, e foi possível demonstrar que, enquanto em células procariontes a molécula de DNA inicia a replicação em um único local, chamado origem de replicação, em células eucariontes existem múltiplas origens. Assim, essas células solucionaram o problema de replicar seu enorme genoma no curto espaço de tempo de S e superaram a baixa velocidade de sua replicação. O número de origens de replicação depende do organismo, do tipo celular e é regulado ao longo do desenvolvimento. Esse número pode ser de uma origem a cada 3 ou 300 kpb (3 mil ou 300 mil pares de bases). Como exemplo, em um cromossomo humano médio existem, pelo menos, 200 pontos de origem. Como muitos genes ativos replicam no início da fase S, é possível que o papel de origens de replicação específicas seja o de coordenar a replicação do DNA com a transcrição dos genes.

Células eucariontes, ao iniciarem a replicação em várias origens, apresentam então muitas unidades de replicação distribuídas ao longo do genoma, as quais se denominam réplicons. Em cada núcleo de mamífero existem 20.000 a 30.000 réplicons. As unidades de replicação que iniciam simultaneamente a síntese de DNA constituem as chamadas famílias de réplicons (em inglês, *replicon clusters*), e diferentes famílias destas iniciam em diferentes tempos.

Cabe ressaltar que, a cada fase replicativa, todas as unidades de replicação do genoma nuclear são replicadas e que cada réplicon replica somente uma vez, dentro de um único

período S. Um complexo enzimático isolado de leveduras, chamado complexo de reconhecimento da origem (ORC, em inglês), liga-se às origens de replicação e sinaliza para que outras proteínas reguladoras venham a se ligar também. Entre estas proteínas, está um grande complexo proteico, o complexo pré-replicativo ou pré-RC. Quando o complexo pré-RC liga-se a uma origem de replicação, o complexo ORC é fosforilado e o processo de replicação é iniciado. Depois de ocorrida a replicação, o complexo pré-RC se desliga daquela origem de replicação, impedindo outra leitura da mesma origem.

▪ A replicação é bidirecional

Uma vez iniciada a replicação em cada ponto de origem, ela se propaga para os dois lados da molécula de DNA, ou seja, em ambas as direções, até encontrar, em qualquer ponto, os extremos das cadeias em formação dos réplicons adjacentes. A esse movimento para lados opostos se denominou replicação bidirecional. Estudos radioautográficos ao microscópio eletrônico do cromossomo de *E. coli* em divisão mostraram que a incorporação de timidina-H^3 ocorre principalmente onde os dois filamentos de DNA da dupla hélice se separam. Esses locais têm a forma da letra Y e são chamados de forquilhas de replicação (Figura 9.5). A replicação bidirecional envolve duas forquilhas de replicação, que se movem em direções opostas.

▪ A replicação é semidescontínua

A radioautografia demonstra também que as duas cadeias parentais da dupla hélice vão, ambas, sendo replicadas em cada forquilha de replicação que avança. Como veremos mais adiante, a enzima responsável pela polimerização dos desoxirribonucleotídios na síntese do DNA, a DNA-polimerase, polimeriza somente na direção 5'→ 3', e, então, ambas as cadeias-filhas devem ser sintetizadas na direção 5'→ 3'. Mas, conforme foi explicado no Capítulo 3, os dois filamentos de DNA da hélice dupla são antiparalelos, isto é, um deles tem a direção 5'→ 3' e o outro a direção contrária, 3'→ 5'. Se as duas cadeias são antiparalelas, surge a pergunta: como elas podem ser polimerizadas simultaneamente e a forquilha de replicação avançar em um único sentido? Parece claro que as maneiras de sintetizar as duas cadeias-filhas são diferentes, seguindo um padrão de replicação semidescontínua. Ocorre que, tomando como referência o sentido do movimento da forquilha de replicação, a cópia da cadeia parental 3'→ 5' pode ser sintetizada continuamente. Essa cadeia-filha, que avança na direção 5'→ 3', recebe o nome de cadeia líder ou cadeia contínua (em inglês, *leading strand*). A outra cadeia parental, 5'→ 3' tem de ser copiada de um modo intermitente, descontínuo, por meio da síntese de uma série de fragmentos, que, depois de unidos, dão origem a uma cadeia denominada cadeia retardatária ou cadeia descontínua (em inglês, *lagging strand*), conforme esquematizado na Figura 9.7. Os fragmentos da cadeia descontínua receberam o nome de fragmentos de Okazaki (nome do pesquisador que os descreveu, em 1968) e são cadeias curtas com um comprimento aproximadamente constante de 1.000 a 2.000 nucleotídios em *E. coli* e de 200 a 300 nucleotídios em células eucariontes.

A

B

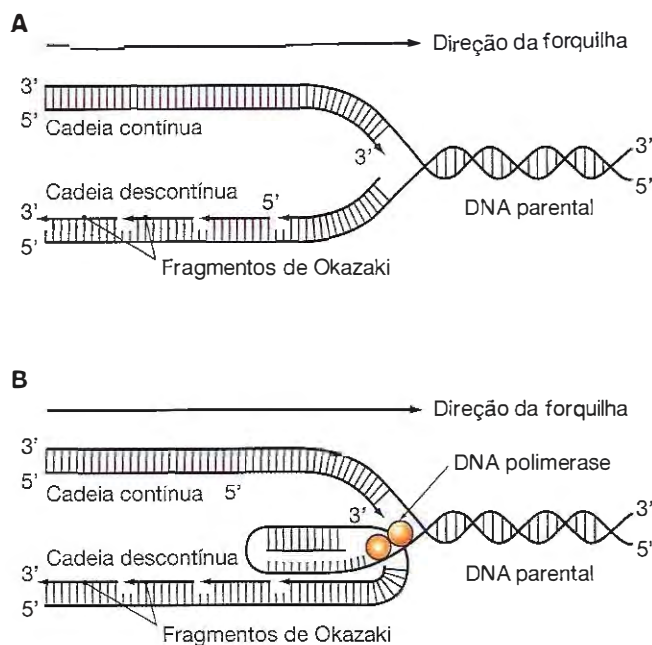



Figura 9.7 ▪ Modelo de replicação semidescontínua do DNA. Por causa da característica da DNA-polimerase, as duas cadeias novas devem ser sintetizadas na direção 5'→ 3'. Assim, em **A**, a cadeia que usa como molde a fita 3' → 5' é sintetizada de maneira contínua (também chamada de *cadeia líder*) e a outra cadeia parental, a 5' → 3', é copiada de uma maneira descontínua, por meio da síntese de uma série de segmentos nucleotídicos denominados *fragmentos de Okazaki*. A cadeia sintetizada por fragmentos recebe o nome de *cadeia descontínua* ou *cadeia retardatária*. Os fragmentos de Okazaki são posteriormente substituídos em parte e ligados por DNA-ligase para formar uma cadeia ininterrupta. Em **B**, observa-se que as duas cadeias novas são polimerizadas pela mesma DNA-polimerase dimérica, o que obriga a cadeia parental 5'→ 3' a enrolar-se, assumindo a chamada *forma de trombone*. Esse arranjo facilitaria a adição de um novo 5'-nucleotídio à extremidade 3'-OH de ambas as cadeias nascentes.

▪ A replicação do DNA é realizada por enzimas

Tanto as células procariontes como as eucariontes têm enzimas denominadas DNA-polimerases (DNApol), capazes de sintetizar DNA a partir de seus precursores. Para catalisarem essa síntese, os precursores de DNA devem estar presentes sob a forma de trifosfatos de desoxirribonucleosídios ou desoxirribonucleotídios trifosfatados. Os quatro desoxirribonucleotídios trifosfatados necessários para a síntese de DNA são dATP, dCTP, dTTP e dGTP, contendo as bases adenina (A), citosina (C), timina (T) e guanina (G), respectivamente. Além de serem moléculas estruturais, esses desoxirribonucleotídios proporcionam energia para a síntese dos novos filamentos de DNA, porque, enquanto são precursores, estão trifosfatados, mas, quando incorporados na nova cadeia de DNA, o são apenas na forma de monofosfatos. A ruptura das ligações fosfato excedentes fornece a energia necessária para a síntese de DNA. Simultaneamente, fosfato inorgânico é liberado. Todas as DNA-polimerases descobertas até hoje obedecem às seguintes propriedades:

- cada desoxirribonucleotídio a ser incorporado é selecionado de modo que sua base nitrogenada seja complementar e possa então parear com bases da cadeia molde, sempre fazendo pareamentos AT e GC. Portanto, a sequência de bases na nova molécula de DNA depende exclusivamente da sequência existente na molécula antiga

- o crescimento da cadeia sempre se dá na direção 5'→3', ou seja, a enzima sempre adiciona um monofosfato de desoxirribonucleosídio (com o fosfato ligado ao carbono que ocupa a posição 5' da pentose – C5') a um C3' livre de um nucleotídio preexistente
- DNA-polimerases não conseguem iniciar a síntese *de novo*, todas requerem um segmento inicial de nucleotídios (chamado *primer*) para dar continuidade à cadeia. Elas só conseguem alongar cadeias preexistentes, e não podem juntar dois desoxirribonucleotídios por meio da formação de uma ponte fosfodiéster inicial.

Em *E. coli*, a principal enzima na duplicação do DNA é a DNA-polimerase III (pol III), da qual existem apenas 10 moléculas por célula. A DNA-polimerase I (300 a 400 moléculas por célula) e a DNA-polimerase II (40 moléculas por célula) são mais abundantes na célula, uma vez que elas têm funções adicionais, seja no processo de reparo do DNA, seja como exonucleases, removendo nucleotídios já incorporados.

Células eucariontes apresentam, pelo menos, quatro DNA-polimerases localizadas no núcleo. As DNA-polimerases α e δ (letras gregas, *alfa* e *delta*, respectivamente) são as responsáveis pela replicação do DNA nuclear e corresponderiam à polimerase III de *E. coli*. Durante a replicação do DNA nuclear, parece que essas duas enzimas, em uma conformação dimérica, exercem suas funções simultaneamente. Em função de suas características particulares, presumivelmente, a *pol* δ replica a cadeia contínua, enquanto a *pol* α replica de maneira descontínua a outra cadeia, a retardatária. A polimerase ε (*epsílon*) parece estar relacionada com os mecanismos de reparo, embora sua função precisa permaneça incerta. A quarta enzima de localização nuclear, a DNA-polimerase β (*beta*), é pequena e funciona no processo de reparo. Ainda existe a DNA-polimerase γ (*gama*), que é responsável pela replicação do DNA presente nas mitocôndrias.

▪ *Outras enzimas estão envolvidas na replicação*

Para que o processo de replicação ocorra, são necessárias muitas outras enzimas com funções específicas, além das DNA-polimerases (Figura 9.8).

Inicialmente, é preciso desenrolar as voltas da dupla hélice de DNA para expor os moldes de cadeia simples à ação da polimerase, problema mais complexo na cromatina das células eucariontes, mas também existente no DNA circular enovelado das células procariontes. O desenrolamento da dupla hélice é feito pela enzima helicase, que trabalha em cada forquilha de replicação, à frente da polimerase, desenrolando progressivamente as cadeias em ambas as direções. A ligação da helicase só ocorre após a ação de uma proteína chamada DnaA, que, inicialmente, causa a separação das cadeias nas origens de replicação. Como as duas cadeias de DNA da molécula original estão firmemente ligadas graças às numerosas pontes de hidrogênio entre suas bases (Capítulo 3), o processo de desenrolamento envolve também a quebra das pontes de hidrogênio, para separar as duas cadeias da dupla hélice que vão ser copiadas. Nesse processo atua também a helicase, consumindo energia fornecida pelo ATP. A porção desenrolada de DNA deve ser então estabilizada, o que é feito com a participação de proteínas específicas, as proteínas SSP (*single strand proteins*), que, ao se ligarem às regiões de cadeias simples do DNA, mantêm os filamentos separados, enquanto se processa a replicação. Essas proteínas impedem que as pontes de hidrogênio entre as bases se refaçam, depois de desfeitas pela helicase; evitam que essas regiões sofram torções, além de protegerem os filamentos simples da eventual degradação por nucleases (Figura 9.8).

Dadas as características da molécula de DNA, no entanto, o desenrolamento da dupla hélice no ponto de origem leva a um superenrolamento positivo do DNA mais adiante, e essas voltas adicionais na hélice ainda se acentuam mais à medida que a forquilha de replicação aumenta de tamanho. Para impedir que esse superenovelamento ocorra, entram em ação enzimas denominadas DNA-topoisomerases, dentre as quais um dos tipos é conhecido como DNA-girase. Essas enzimas, para relaxarem o estresse contorcional imposto pelo desenrolamento, introduzem quebras, seguidas de reuniões das ligações fosfodiéster na molécula de DNA; suas ações também consomem energia fornecida pelo ATP.

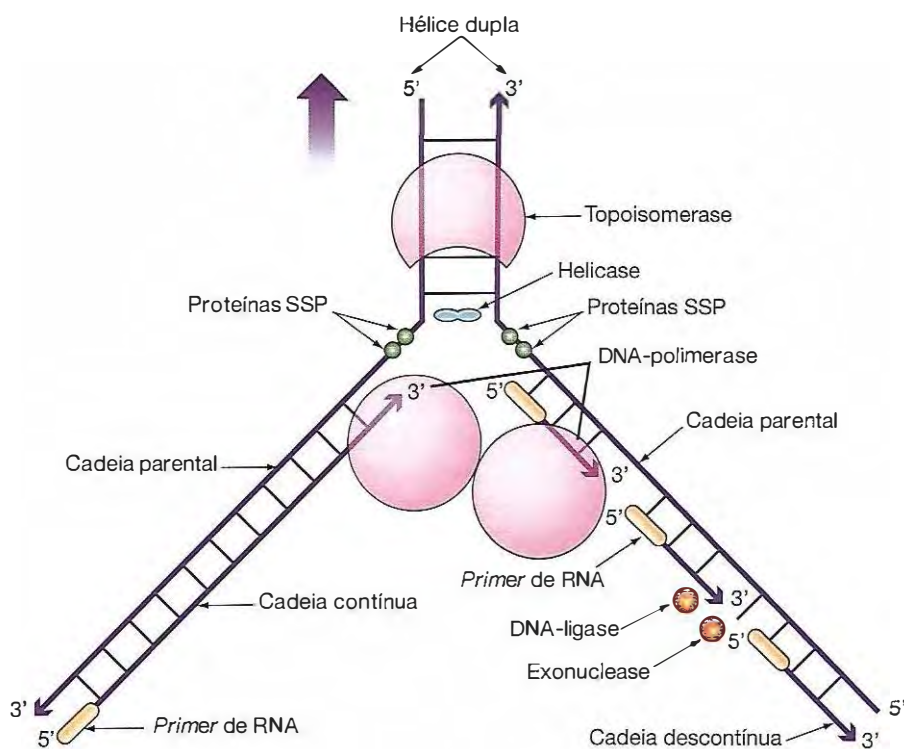



Figura 9.8 ▪ Esquema mostrando as enzimas que participam da replicação do DNA em cada forquilha de replicação. A dupla hélice é desenrolada pela ação da helicase auxiliada pela topoisomerase, e as cadeias simples são cobertas pelas proteínas SSP, que estabilizam essa configuração aberta. A DNA-polimerase pode atuar diretamente polimerizando a cadeia contínua. Na cadeia descontínua, ela atua após a síntese de pequenos segmentos iniciadores de RNA (*primers* de RNA) feitos pela RNA-polimerase. Posteriormente, os *primers* são removidos por outra DNA-polimerase com atividade de exonuclease, o espaço é preenchido e a molécula é unida pela DNA-ligase.

Como mencionado anteriormente, as DNA-polimerases não conseguem iniciar a síntese de DNA sem o auxílio de uma pequena sequência inicial ou *primer*, porque ela só é capaz de adicionar nucleotídios a um polinucleotídio preexistente (Figura 9.8). Esses *primers* são segmentos curtos de RNA, com 1 a 60 nucleotídios de comprimento, dependendo da espécie (em *E. coli* têm cerca de 5 nucleotídios, por exemplo), cuja sequência é, naturalmente, complementar à do DNA molde. Os *primers* que fazem parte dos pequenos fragmentos de Okazaki da cadeia descontínua são produzidos pela ação de uma RNA-polimerase especial, denominada primase. Nas células eucariontes, a atividade de primase está localizada em subunidades da própria DNA-polimerase α, mas o *primer* para a cadeia contínua de DNA é sintetizado pela RNA-polimerase que, em geral, sintetiza RNA na transcrição. Nos dois casos, a DNA-polimerase (a III, em procariontes, e as DNA-polimerases α e δ, em eucariontes), catalisam a extensão do *primer*, formando, sempre na direção $5' \rightarrow 3'$, um filamento de DNA que contém um curto segmento inicial de RNA. Posteriormente, pela ação de outras DNA-polimerases, que apresentam atividade exonuclease 5', os *primers* de RNA são removidos e substituídos por desoxirribonucleotídios. Os fragmentos agora completos são finalmente unidos por outra enzima, a DNA-ligase.

▪ *A replicação e a reorganização da fibra de cromatina*

Nas células eucariontes, como o DNA está ligado a proteínas, constituindo a cromatina, não é apenas o DNA que deve ser replicado na fase S, mas também as histonas, como já mencionado. O processo replicativo envolve então a passagem do conjunto de enzimas da replicação através da molécula de DNA, que se apresenta organizada em nucleossomos. A fibra nucleossômica certamente se desorganiza durante essa passagem, mas ainda não se sabe se, nesse momento, as histonas são completamente dissociadas do DNA. A montagem do DNA recém-duplicado em nucleossomos parece ocorrer logo atrás da forquilha de replicação, de tal modo que, conforme esta avança, a fibra nucleossômica vai sendo imediatamente reestruturada nas duas novas moléculas de DNA nascentes. Essa montagem é mediada por proteínas específicas que se ligam às histonas nucleossômicas e as transferem ao DNA, primeiramente ocorrendo a associação dos tetrâmeros de histonas H3 e H4, seguida da associação de dímeros de H2A e H2B. Esses nucleossomos são formados tanto a partir de histonas recém-sintetizadas em S como de histonas provenientes da desagregação de nucleossomos preexistentes, em uma combinação ao acaso.

▪ As células apresentam mecanismos para manter a integridade do seu DNA

Apesar de complexa, a replicação do DNA é extremamente precisa, estimando-se que apenas um erro seja cometido na replicação de 10^8 bases. Essa precisão se deve principalmente a uma propriedade especial da DNA-polimerase: ela é capaz de conferir as bases, à medida que as adiciona ao novo filamento de DNA. Essa característica da enzima DNA-polimerase chama-se "leitura de prova" (do inglês, *proofreading*). A DNA-polimerase confere as bases adicionadas e remove imediatamente uma base errada, antes que a síntese do filamento de DNA continue. Seria como uma correção tipográfica em que a letra errada fosse corrigida antes de terminada a palavra inteira. No entanto, algumas bases incorretamente emparelhadas conseguem, ainda assim, escapar dessa correção de provas, e o DNA pode sair com defeitos dessa replicação, que não apresenta fidelidade absoluta.

Por outro lado, macromoléculas biológicas são suscetíveis a alterações químicas que surgem de erros durante a síntese, ou mesmo de exposições a fatores deletérios do ambiente. O DNA sofre a ação de agentes físicos e de muitos agentes químicos, alguns produzidos normalmente na própria célula. Os raios cósmicos e outras radiações com muita energia podem causar lesões por atuação direta no DNA, como modificações nas bases ou ruptura da dupla cadeia. Também podem atuar indiretamente sobre o DNA, porque induzem o aparecimento de íons superóxido, quimicamente muito ativos. A radiação ultravioleta solar, embora tenha energia muito menor, também pode causar alterações como a formação de dímeros de timinas adjacentes na cadeia de DNA.

As células apresentam vários sistemas gerais para proteger seu DNA e outras moléculas. Os íons superóxido, por exemplo, são destruídos pela enzima superóxido-desmutase. Os íons H^+ são neutralizados pelos sistemas reguladores do equilíbrio ácido-básico, e as oxidações intracelulares são reduzidas por diversos sistemas redutores, como o $NADPH_2$, a glutationa e a vitamina E.

Os danos causados ao DNA são particularmente graves porque o DNA constitui o material genético que contém todas as informações para a estrutura e para as atividades celulares. A alteração do DNA de uma célula somática é transmitida às células-filhas, podendo formar-se um clone de células modificadas. Quando as alterações do DNA ocorrem em uma célula germinativa (óvulo, espermatozoide ou respectivos precursores), podem passar para as gerações futuras dos organismos atingidos, sendo seus efeitos ainda mais prejudiciais para a espécie. Em função dessa importância, além de ter alta fidelidade no processo de sua síntese, o DNA é a única molécula que, se danificada, pode ser reparada pela célula.

Os mecanismos de reparo são muito diversificados, e, assim, a eficiência aumenta diante do tipo de lesão presente no DNA.

O reparo do DNA danificado é feito em duas fases: a primeira, específica para cada tipo de defeito, e a segunda, de natureza geral, igual em todos os casos. A primeira fase é a identificação da alteração e a remoção da parte defeituosa da molécula. Essa fase vale-se de mecanismos diversos para identificar os diferentes defeitos e cortar, por meio de endonucleases (enzimas que cortam pedaços da parte central da molécula de DNA), o segmento de DNA errôneo. Na segunda fase, o segmento removido é substituído por um segmento correto de DNA (Figura 9.9). De fato, quando se colocam as células em presença de um precursor radioativo de DNA, como a timidina-H^3, observa-se que este é incorporado nas células interfásicas principalmente durante o período S; mas, também, uma

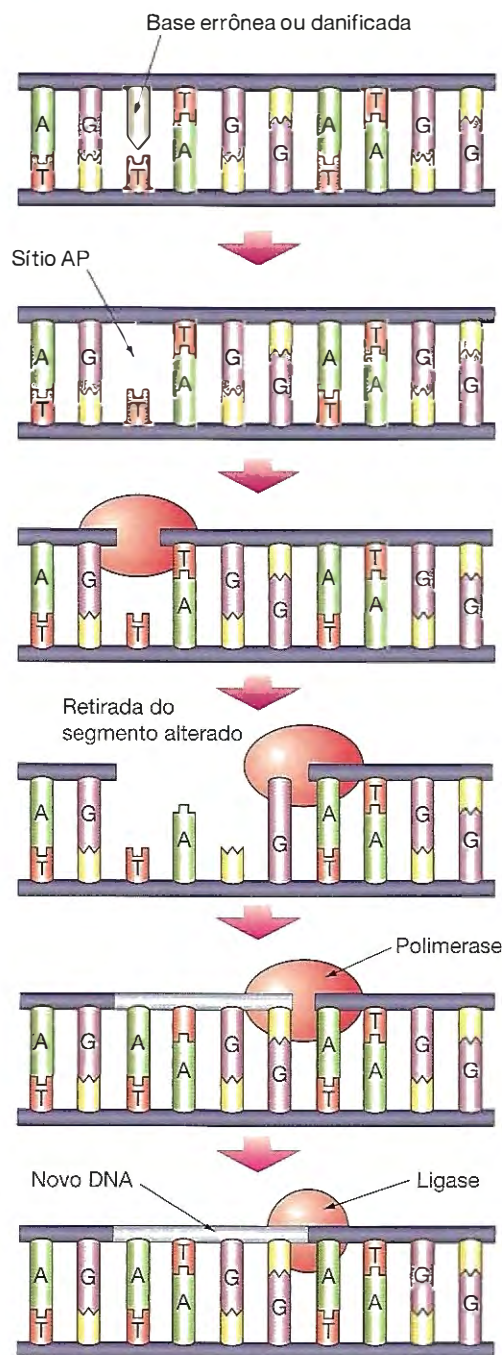



Figura 9.9 ▪ Sequência dos processos em um caso de reparo do DNA. Uma base danificada ou erroneamente incorporada é retirada por ação de enzimas que deixam o local apurinico ou apirimidínico, chamado de sítio AP. Em razão da ação de outras enzimas, o sítio AP e vários nucleotídios adjacentes são retirados da molécula. A lacuna é preenchida pela síntese e ligação de novo segmento na posição original. O fenômeno de reparo do DNA explica a possibilidade de haver uma pequena síntese de DNA em células que não estão se dividindo.

pequena incorporação é detectada ao longo de períodos não sintéticos, provavelmente relacionada com esses processos de reparo do DNA, que exigem determinado nível de síntese.

A importância biológica do reparo do DNA pode ser avaliada tanto pela quantidade de genes envolvidos no processo como pelas consequências em organismos que possuem células incapazes de reparar seu DNA. Exemplo do primeiro caso são as células da levedura, que têm mais de 50 genes diferentes, cujos produtos (proteínas, enzimas) participam do processo de reparo do DNA. Exemplo do segundo é dado pelos pacientes com a doença hereditária *xeroderma pigmentosum*, que apresentam defeitos em, pelo menos, sete produtos gênicos envolvidos no reparo do DNA. As vítimas dessa doença são extremamente sensíveis à radiação ultravioleta do sol e apresentam lesões cutâneas graves e câncer de pele, mesmo com pequenas exposições à luz solar. No *xeroderma pigmentosum*, as células são incapazes de corrigir a dimerização das bases pirimídicas, produzida pela ação da radiação ultravioleta.

▪ Período G_2

No período G_2 ocorrem os preparativos necessários para a próxima mitose, mas nem todos são conhecidos. Sabe-se, porém, que, antes de a célula passar pelo ponto de transição G_2/M, é criticamente fundamental que a replicação tenha sido completada e que possíveis danos do DNA tenham sido completamente reparados. Um dos mais bem definidos pontos de checagem do ciclo celular ocorre, então, em G_2, no qual a célula permanece até que todo o seu genoma seja completamente replicado e reparado antes de ser igualmente repartido e transmitido a cada célula-filha. Existem mecanismos sensores, de natureza molecular ainda desconhecida, que detectam qualquer anormalidade na replicação e enviam sinais negativos para o sistema de controle do ciclo, bloqueando a ativação das moléculas que desencadeiam a entrada em mitose.

Neste período, ainda são sintetizadas as proteínas não histônicas, que se vão associar aos cromossomos durante a sua condensação na mitose. Também ocorre o acúmulo de um complexo proteico citoplasmático, o dímero denominado complexo ciclina-Cdk (Cdk, do inglês *cyclin-dependent kinases*) que tem importância no controle de todo o ciclo. Ele é considerado o regulador geral da transição de G_2 para M, induzindo a entrada em mitose e sendo responsável por quatro eventos típicos dessa fase: condensação cromossômica, ruptura do envoltório nuclear, montagem do fuso e degradação da proteína ciclina. Detalhes sobre o complexo ciclina-Cdk e seus mecanismos de ação serão vistos mais adiante, no item *Controle genético do ciclo celular*. Ainda durante G_2, ocorre a síntese de RNA, principalmente daqueles extranucleolares, e continua a síntese geral de proteínas iniciada no período G_1. Esses processos sintéticos só se interrompem no período seguinte, a mitose.

▪ Mitose: a divisão do núcleo é seguida pela divisão citoplasmática

A divisão celular é o período em que a célula reparte igualmente o seu conteúdo, já duplicado na intérfase, em duas células, denominadas células-filhas. Esse período inclui essencialmente dois processos: a partilha exata do material nuclear, chamada, no sentido estrito, de mitose (do grego *mitos*, fio, filamento) ou cariocinese (*kario*, núcleo, e *kinesis*, movimento), e a divisão citoplasmática ou citocinese (*kitos*, célula). Em sentido amplo, no entanto, costuma-se identificar a mitose como a própria divisão celular. Para facilitar seu estudo, a mitose é subdividida em quatro etapas: prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figuras 9.10 e 9.11).

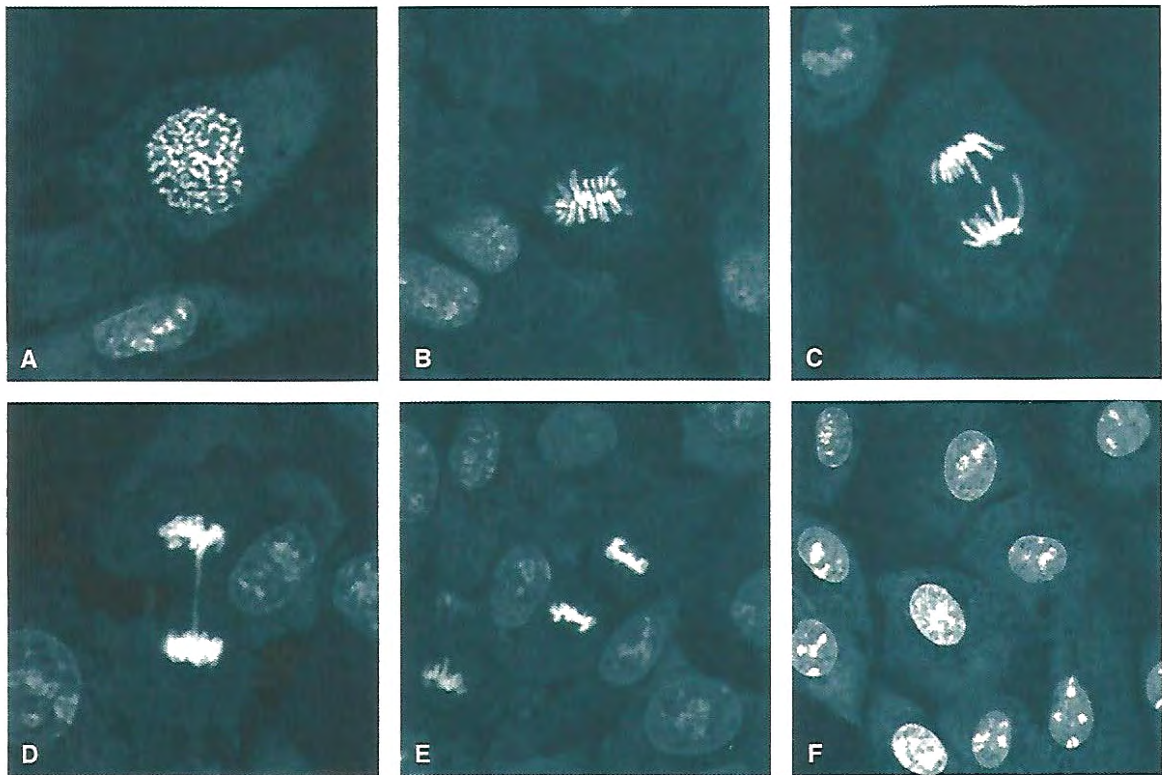



Figura 9.11 ▪ Imagens obtidas em microscópio confocal de varredura a *laser* de células cultivadas e coradas pelo iodeto de propídio, em diferentes fases do ciclo celular. Grande aumento. **A**, prófase; **B**, metáfase; **C**, anáfase; **D**, telófase inicial, em que é visível uma ponte cromossômica, representando uma alteração mitótica; **E**, telófase final; **F**, células em intérfase. (Cortesia de Renata Manelli-Oliveira e Prof.ª Gláucia M. Machado-Santelli. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.)

▪ Prófase

A prófase (*pro*, primeira) caracteriza-se pela condensação gradual das fibras de cromatina, inicialmente com 30 nm de diâmetro e muito alongadas no núcleo, que vão progressivamente tornando-se mais curtas e espessas, até formar cromossomos. Estes chegam a alcançar um nível de condensação aproximadamente 1.000 vezes superior ao estado em que a fibra cromatínica se apresenta na intérfase. O processo torna os cromossomos visivelmente individualizados (Figura 9.11A) e nitidamente compostos por seus dois elementos longitudinais idênticos, as cromátides, as quais carregam o material genético duplicado na intérfase anterior. As duas cromátides de um cromossomo são mantidas unidas na região centromérica, desde a replicação até a anáfase, por pontes formadas por um complexo de proteínas denominadas coesinas (Capítulo 8, Figura 8.21). A condensação cromossômica é fundamental para evitar o emaranhamento ou rompimento do material genético durante sua distribuição às células-filhas. Desse processo participam as proteínas condensinas que, conforme visto no Capítulo 8 (Figura 8.21), apresentam estrutura semelhante às coesinas e são responsáveis pelo estabelecimento das alças que compactam o cromossomo. A condensação é induzida pelo complexo ciclina-Cdk, que, quando ativado, fosforila as condensinas. As condensinas fosforiladas, por sua vez, ligam-se à cromatina e promovem a condensação progressiva das fibras, até formar os cromossomos. Várias evidências indicam que a fosforilação das histonas H1 e H3, pelo complexo ciclina-Cdk (o que depende da atividade da quinase denominada Aurora B), também contribui para o processo de condensação. Em consequência da condensação progressiva e também da ação da ciclina-cdK, que fosforila componentes do complexo de transcrição, a cromatina vai se tornando inativa, deixando de transcrever RNA, até que, finalmente, as sínteses de mRNA e de rRNA param e a de tRNA se reduz consideravelmente.

Com a interrupção da transcrição de rRNA, novas moléculas constituintes da região fibrilar do nucléolo deixam de ser sintetizadas. As já existentes (transcritos nascentes) vão progressivamente sendo completadas e vão se associando a elementos da região do componente fibrilar denso (CFD) do nucléolo. Enquanto fatores de transcrição permanecem ligados às regiões organizadoras do nucléolo (NOR) durante a mitose, algumas subunidades da RNA *pol I* dissociam-se temporariamente das NOR e deixam o centro fibrilar (CF) do nucléolo. No final da prófase, quando a cromatina torna-se mais condensada, fatores de processamento do rRNA (como, por exemplo, fibrilarina e B23, respectivamente do CFD e do componente granular, CG) e os RNA pré-ribossômicos parcialmente processados (pré-rRNA), que haviam se associado ao CFD, deixam simultaneamente o nucléolo. Estes passam ao citoplasma e se dispersam, ou cobrem a superfície dos filamentos cromossômicos em condensação e permanecem próximos a estes constituindo uma região pericromossômica. Assim, os nucléolos se desorganizam nesta fase e voltam a se organizar na telófase.

Enquanto isso, no citoplasma, centrossomos agem na formação do fuso como centros nucleadores da polimerização de tubulina em microtúbulos. Os centrossomos são estruturas que, nas células animais, são constituídas por um par de centríolos (denominado diplossomo) e um material pericentriolar amorfo e eletrondenso, a partir do qual emanam fibras de microtúbulos radiais. Os centrossomos mais as fibras radiais compõem o chamado áster. A maioria das células vege-

tais e muitos eucariontes unicelulares, como a *Amoeba proteus*, não têm centríolos nem fibras do áster em seus centrossomos. Estas últimas células, portanto, caracterizam-se por ter mitose anastral, enquanto as demais têm a chamada mitose astral. Em ambos os casos, nesta fase existem dois centrossomos no citoplasma, em função de já terem sido duplicados na intérfase, os quais migram para polos opostos da célula. À medida que se afastam, entre eles são polimerizados microtúbulos, usando moléculas de tubulina liberadas na desmontagem do citoesqueleto da célula interfásica (Figura 9.10). Feixes de microtúbulos irão constituir as fibras do fuso.

Cabe ressaltar que alguns organismos eucariontes unicelulares, como leveduras, fungos filamentosos e alguns protistas, seguem um tipo de divisão chamado mitose fechada, em que o envoltório nuclear permanece intacto e o fuso se forma no interior do núcleo. Em eucariontes superiores, entretanto, a mitose geralmente é aberta, caracterizada pela desintegração completa do envoltório nuclear para permitir o acesso dos microtúbulos do fuso aos cromossomos. Então, física e temporalmente coordenada com outros eventos do ciclo, quando os cromossomos estão quase em fase final de condensação e os centrossomos ocupam posições opostas, ocorre a desmontagem do envoltório nuclear, que envolve modificações de todos os seus componentes já mencionados no Capítulo 8. As membranas nucleares se rompem em vários pontos simultaneamente, originando vesículas membranosas, morfologicamente semelhantes às vesículas do retículo endoplasmático, que se dispersam no citoplasma; os complexos de poro se dissociam e a lâmina nuclear se despolimeriza. Ainda não é claro o que dispara a fragmentação do envoltório nuclear, e vários mecanismos parecem contribuir para isso. Em algumas espécies, propõe-se que seja iniciada com a desmontagem dos complexos de poro que está correlacionada com prévia alteração na permeabilidade dos poros. Em outros casos, observa-se que nucleoporinas presentes em ambas as faces dos poros nucleares atraem o complexo COP I (coatômero que promove formação de vesículas, descrito, adiante, no Capítulo 10) e sua maior concentração poderia remodelar o envoltório nuclear em vesículas. Por outro lado, interações de microtúbulos dos centrossomos com o envelope nuclear geram forças mecânicas que contribuem com a ruptura das laminas, em um movimento mediado pela dineína; mas, a fosforilação de proteínas intrínsecas da membrana nuclear, como a gp210, e das diferentes proteínas laminas é fator crucial para o desmantelamento do envoltório. Essa fosforilação é feita pelo complexo ciclina-Cdk e por várias quinases. As laminas fosforiladas se dissociam em dímeros de laminas livres, levando à desmontagem da lâmina nuclear. Consequentemente, as membranas nucleares se fragmentam em vesículas.

Com a ruptura do envoltório nuclear, alguns microtúbulos se prendem aos cinetócoros, que, na altura dos centrômeros dos cromossomos, agora se apresentam maduros. Estes passam a ser chamados de microtúbulos cinetocóricos (Figura 9.12). São eles os responsáveis por direcionar os cromossomos para a região equatorial da célula. Estes últimos eventos da prófase,

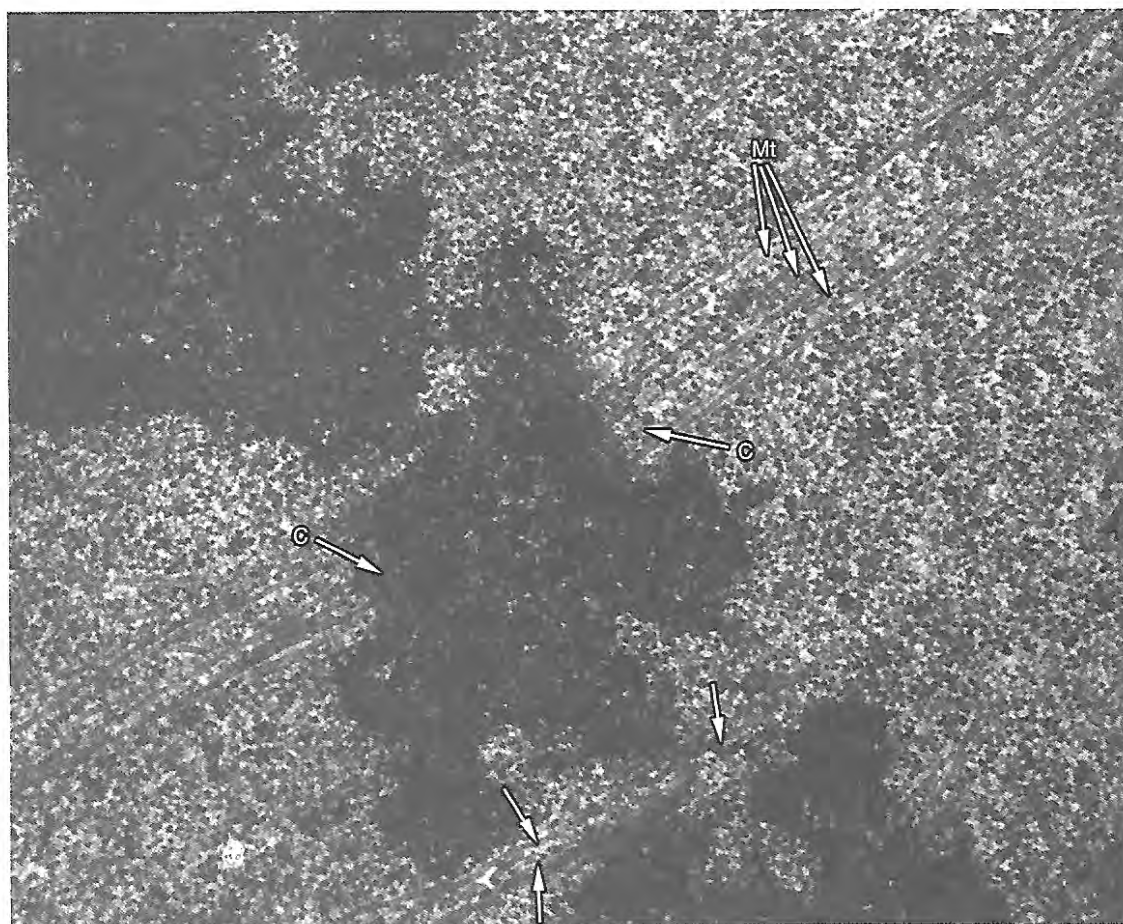



Figura 9.12 ▪ Cromossomos de célula humana em metáfase da mitose. Observe a estrutura densa dos cromossomos comparada com o citoplasma. Feixes de microtúbulos (Mt) inserem-se nos cinetócoros (C) posicionados nos centrômeros. Embaixo (*setas*), um feixe de microtúbulos polares, que atravessam a placa de cromossomos e ligam-se aos polos. 1.000.000× de aumento. (Cortesia de R. McIntosh.)

desde a ruptura do envoltório nuclear, são considerados, por muitos autores, como pertencentes a uma fase distinta, que denominam prometáfase.

Metáfase

Na metáfase (*meta*, metade), os cromossomos atingem um avançado estado de condensação e, portanto, é o momento em que as duas cromátides se tornam realmente visíveis ao microscópio óptico. O início desta fase é definido pela complementação do alinhamento dos cromossomos na região equatorial da célula, formando a denominada placa metafásica (Figura 9.11B). Os cromossomos são mantidos nessa posição por um curto período de tempo por forças que estão igualmente distribuídas entre os dois polos celulares exercidas pelos microtúbulos do fuso. O fuso, assim, é constituído de dois hemifusos (Figuras 9.10 e 9.13). Estes se compõem de três tipos de fibras: as polares, que partem dos centrossomos localizados nos dois polos opostos e que se interdigitam na região central da célula, sem alcançar o polo oposto; as cinetocóricas, que ligam cada cromossomo aos dois polos opostos; e as fibras livres, mais curtas e não ligadas aos polos ou aos cinetócoros, de origem e função desconhecidas. Nessa fase, a superfície dos cromossomos, com exceção dos centrômeros, fica recoberta por uma camada de espessura irregular, a região pericromossômica, constituída por componentes de processamento de rRNA. Do antigo envoltório nuclear, acredita-se que a maioria dos complexos de nucleoporinas solúveis e as laminas estejam distribuídas no citoplasma e que todas as proteínas transmembranosas tenham sido deslocadas para os túbulos do retículo endoplasmático (RE). Observa-se que o RE mostra-se, nesta e na fase seguinte da mitose, como uma densa e dinâmica rede de túbulos e não em cisternas achatadas como é observado na intérfase.

Anáfase

Na anáfase (*ana*, movimento) começam os eventos finais da mitose, quando ocorre a ruptura do equilíbrio metafásico, com a separação e a migração das cromátides-irmãs, que passam a ser chamadas de cromossomos-filhos (Figura 9.11C). Essa liberação das cromátides-irmãs, que permite sua segregação, decorre da degradação da coesina centromérica por uma protease chamada separase. Durante a migração, os microtúbulos das fibras cinetocóricas encurtam, por perda de dímeros de tubulinas nas extremidades polares, e assim aproximam os cromossomos-filhos dos polos. Concomitantemente, moléculas de tubulina são adicionadas à extremidade distal (livre) dos microtúbulos polares, que, ao crescerem, aumentam a distância entre os polos (Figura 9.10). Ao mesmo tempo e, aparentemente, com ajuda de outras proteínas motoras, como a dineína, ocorre deslizamento entre as fibras polares do fuso, que estão interdigitadas na porção central. Ainda que o mecanismo da migração seja objeto de muita especulação, não há dúvida de que seu deslocamento depende dos microtúbulos, pois, quando estes não são polimerizados ou são despolimerizados por agentes antimitóticos, como colchicina ou vimblastina, as mitoses estacionam na metáfase. Quanto aos elementos do antigo nucléolo (proteínas de processamento inicial e tardio do rRNA, snoRNA, pré-rRNA parcialmente processados), tanto permanecem associados aos cromossomos na região pericromossômica, como, os que passaram ao citoplasma, nesta

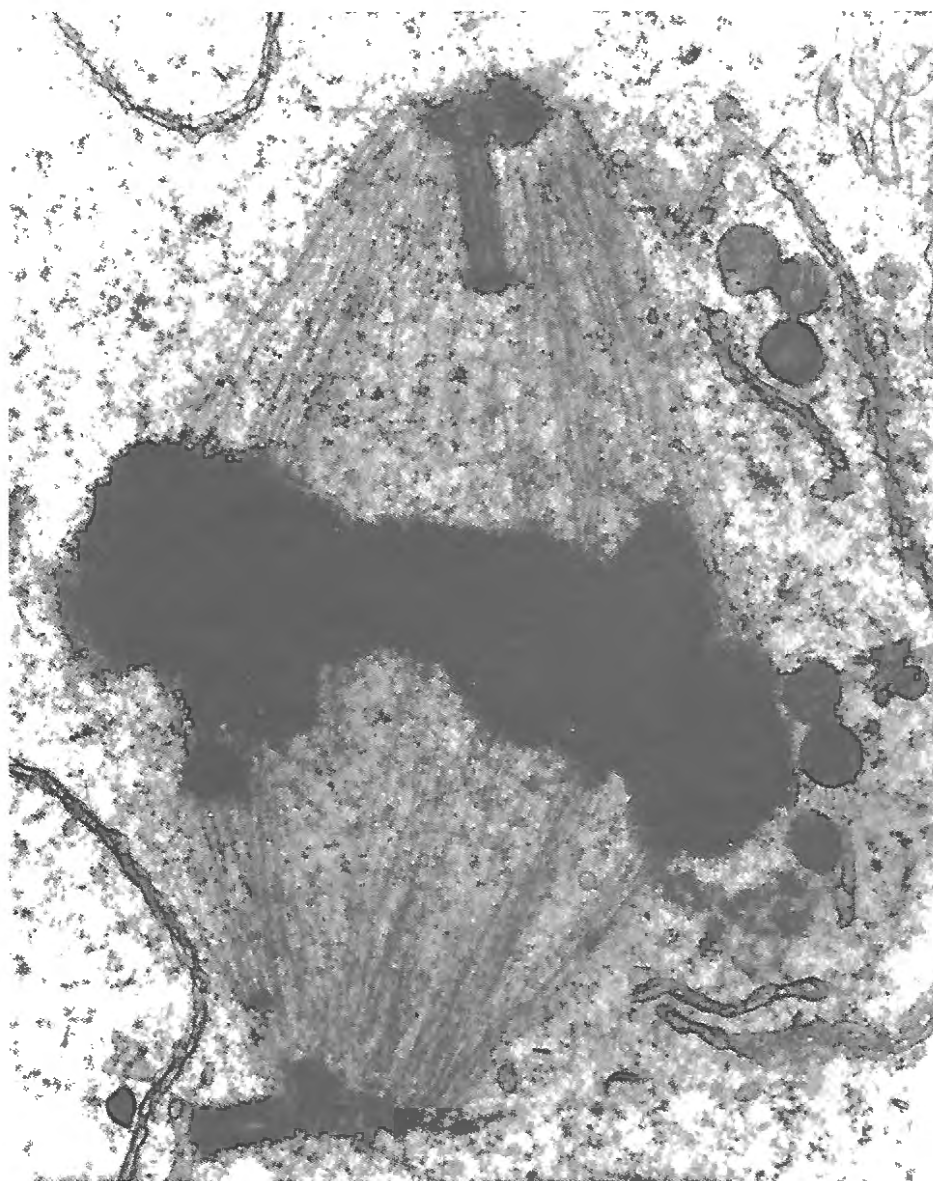



Figura 9.13 ▪ Corte longitudinal de espermatócito em metáfase. Observe os dois centríolos de cada polo, os microtúbulos formando o fuso mitótico e os cromossomos agrupados no equador da célula. No citoplasma, ao redor, mitocôndrias e retículo endoplasmático liso. Aumento: 30.000x. (Cortesia de R. McIntosh.)

fase se empacotam em estruturas de 0,1 a 3 μm de diâmetro (em inglês, *nucleolar-derived foci* – NDF). Ainda, como uma consequência do fato de a mitose ser aberta, cada célula em divisão tem de refazer o envoltório nuclear e restabelecer a identidade do núcleo, o que se inicia no final da anáfase.

Telófase

A telófase (*telos*, fim) inicia-se quando os cromossomos-filhos alcançam os respectivos polos, o que se caracteriza pelo total desaparecimento dos microtúbulos cinetocóricos (Figura 9.11D). Ocorrem, então, a reconstituição dos núcleos e a divisão citoplasmática, levando à formação das células-filhas (Figura 9.11E). A descondensação da cromatina, acompanhada da reaquisição da capacidade de transcrição, a reorganização dos nucléolos e a reconstituição do envoltório nuclear são os principais eventos da reconstrução nuclear, que se processam em sentido essencialmente inverso ao ocorrido na prófase. Esses eventos ocorrem pela inativação do complexo ciclina-Cdk, que foi responsável por iniciar a mitose fosforilando determinadas proteínas celulares. Sua inativação permite que as fosfatases entrem em atividade, desfosforilando essas proteínas, e resultando no término da mitose.

Descobertas recentes têm apoiado a ideia de que os cromossomos-filhos se descondensam porque uma ATPase hexamérica (Cdc48/p97) remove e inativa a quinase Aurora B, permitindo a abertura da estrutura cromatínica e sua descondensação, o que parece ser um requisito para que os envoltórios nucleares sejam refeitos.

As etapas consideradas chaves para a reconstituição do envoltório nuclear em cada polo da célula são: a destinação de membranas para a superfície da cromatina, a fusão de membranas e a incorporação de complexos de poro. Uma pequena GTPase, a proteína Ran, tem papel importante no recrutamento e deposição de proteínas (tais como nucleoporinas e proteínas da membrana nuclear interna) sobre os cromossomos, preparando a remontagem do envoltório nuclear. A Ran controla também a fusão de membranas. Várias outras proteínas envolvidas no processo de fusão de membranas de outras organelas, como as de retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi, parecem também estar presentes. Para que se dê a reconstituição do envoltório nuclear, estudos muito recentes têm mostrado que túbulos mitóticos do retículo endoplasmático (forma recentemente descoberta) começam a se reorganizar em lâminas achatadas depois que as extremidades desses túbulos se associam diretamente com a cromatina. Essa associação se dá por intermédio da ligação de proteínas integrais transmembrana, específicas do envoltório nuclear e distribuídas pelo RE, ao DNA. Estes novos achados contrastam com o modelo anterior de reformulação do envoltório nuclear, que propunha a fusão de vesículas do RE, como principal origem das membranas nucleares interna e externa. Simultaneamente com a reconstituição das membranas, os complexos de poro são remontados a partir do recrutamento de precursores desagregados ao final da anáfase. Uma das questões ainda não esclarecidas, nesse processo, é como as membranas nucleares interna e externa se fundem e geram o poro. A nucleoporina POM121, em ação combinada com o complexo Nup107, é uma proteína-chave para integrar a fusão de membranas com a montagem dos complexos de poro. Várias nucleoporinas têm se mostrado essenciais para esta reassociação, mas seus papéis exatos ainda não foram determinados. Uma vez que a cromatina esteja completamente encerrada pelas membranas contínuas contendo os complexos de poros, as várias proteínas nucleares anteriormente dispersadas são reimportadas por meio dos complexos de poros, levando à expansão do envoltório e ao crescimento do núcleo. Entre essas proteínas estão as laminas solúveis que, ao serem desfosforiladas, voltam a se polimerizar e a reorganizar a lâmina nuclear. Estas mudanças são necessárias para a progressão do ciclo celular e da transcrição.

Os componentes que transcrevem as moléculas de rRNA são desfosforilados, e a transcrição é reativada com a queda dos níveis de ciclina-cdk. Então, ocorre a reorganização do(s) nucléolo(s). Esta resulta de dois processos: (a) retomada da transcrição de moléculas precursoras dos rRNA, a partir do DNA das regiões organizadoras de nucléolos, que, durante a condensação, estavam presentes nas constrições secundárias dos cromossomos; e (b) reagrupamento dos componentes imaturos do antigo nucléolo, que se haviam dispersado pelo citoplasma e constituído, na anáfase, os NDF. Agora, estes podem ser identificados como corpos pré-nucleolares na superfície de cada cromossomo, enquanto decresce o número de NDF e a região pericromossômica se fragmenta. Na telófase final, os componentes de processamento de rRNA iniciais e tardios se realocam, por ordem, nas regiões do CFD e do componente granular do nucléolo, respectivamente.

Em função da despolimerização gradativa dos microtúbulos polares ainda restantes, o sistema microtubular mitótico se desmonta, à medida que a divisão citoplasmática avança.

As características da divisão citoplasmática nas células animais e vegetais

A citocinese ou divisão citoplasmática é parte da telófase, embora muitas vezes tenha início na anáfase e termine ao final da telófase com a formação de duas células-filhas.

Na célula animal, forma-se uma constrição, na altura da região equatorial da célula-mãe, que vai progredindo e termina por dividir o citoplasma, levando à separação das duas células-filhas, cada uma delas recebendo partes iguais do conteúdo citoplasmático. Pela técnica de imunocitoquímica foi demonstrada a presença de miosina e actina na região do estrangulamento que ocorre entre as duas células-filhas na telófase (Figura 9.14). Filamentos de actina dispostos em feixe e interligados por moléculas de miosina II formam um anel contrátil por dentro da membrana e a ela ligado, o que explica o movimento de invaginação da membrana e a constrição que leva à separação das duas células-filhas.

Nas células vegetais, a citocinese acontece com a formação de um tabique ao longo do equador da célula-mãe, primórdio da futura parede celular, denominado inicialmente fragmoplasto (*phragma*, cerca) e, mais tarde, placa celular. Essa formação é oriunda inicialmente do acúmulo, seguido do ordenamento e posterior fusão de vesículas procedentes do complexo de Golgi. A fusão começa no centro da célula e progride em direção às paredes laterais. Com a fusão, a membrana

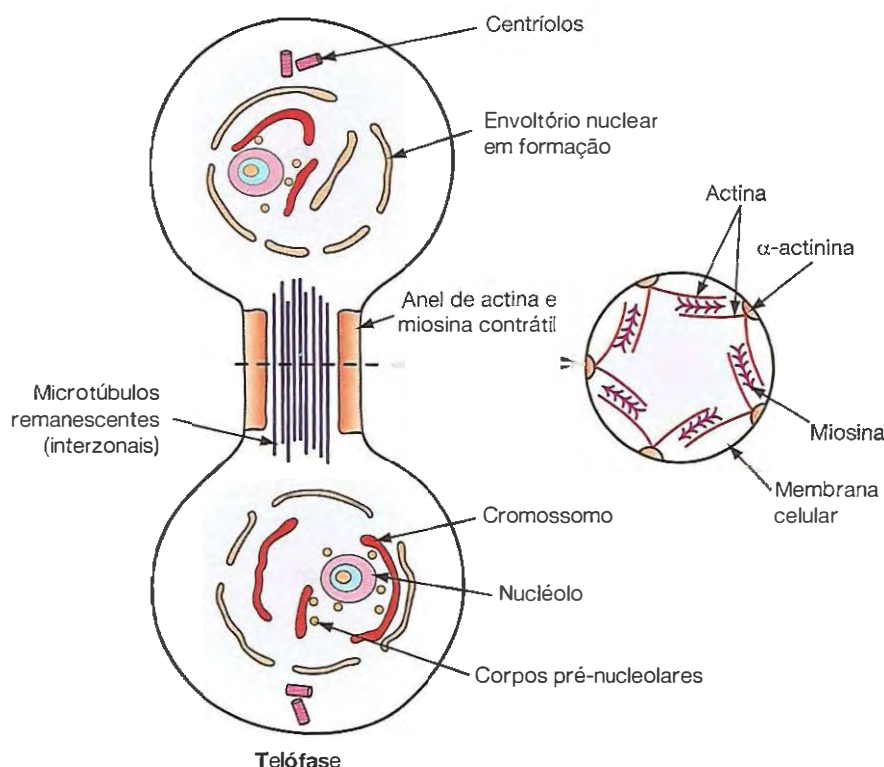



Figura 9.14 ▪ Esquema da célula animal em telófase. O corte longitudinal mostra a constrição que se forma, durante a citocinese, na região equatorial da célula, na qual ainda existem fibras remanescentes do fuso e se forma um anel contrátil, logo abaixo da membrana plasmática. No corte transversal dessa região (*à direita*), a constrição aparece como resultado do movimento de deslizamento entre as proteínas miosina II e actina, que se conecta à membrana por meio da α-actinina. Essa constrição avança até a divisão completa da célula em duas células-filhas.

dessas vesículas constituirá as novas membranas plasmáticas de cada célula-filha nessa região, que ficarão separadas apenas pelo material que era carregado pelas vesículas, material este constituído de polissacarídios da parede celular. O espessamento da parede se dá, posteriormente, por meio de exocitose do conteúdo de novas vesículas direcionadas para essa região (Capítulo 13).

▪ Controle genético do ciclo celular

Nas duas últimas décadas, houve extraordinário avanço no conhecimento sobre os mecanismos moleculares responsáveis por disparar e coordenar a progressão do ciclo celular, especialmente com a descoberta do envolvimento da fosforilação de proteínas nesse controle. Diferentes modelos experimentais, utilizando organismos filogeneticamente tão distantes como leveduras, ouriço-do-mar, anfíbios e mamíferos, favoreceram os estudos sobre a regulação do ciclo.

Com função determinante no controle do ciclo celular foi isolada e caracterizada uma família de enzimas quinases de proteínas, denominadas quinases dependentes de ciclina ou, da sigla em inglês, Cdk. Uma quinase de proteína tem como atividade básica a fosforilação de proteínas-substrato, o que consiste em transferir um grupo fosfato do doador ATP, ou GTP, para aminoácidos aceptores desse fosfato, como serinas ou treoninas. As Cdk são ativadas e inativadas ao longo do ciclo, promovendo, em consequência, padrões cíclicos de fosforilação de proteínas que desencadeiam ou regulam os principais eventos do ciclo. A atividade das Cdk oscila em resposta à associação com proteínas regulatórias denominadas ciclinas. As ciclinas foram assim denominadas porque apresentam um padrão cíclico de acúmulo e degradação durante o ciclo celular. Elas são periodicamente sintetizadas, ao longo de todo o período interfásico, e degradadas rapidamente no final da mitose. Os níveis de Cdk, por sua vez, mantêm-se constantes ao longo de todo o ciclo celular. As ciclinas compreendem uma família de proteínas presente em todos os organismos, da levedura ao homem. Elas têm em comum uma sequência conservada de 100 aminoácidos, chamada box, necessária para ligar-se e ativar a Cdk. Nas células humanas, até o momento, foram caracterizadas cerca de 10 ciclinas diferentes (denominadas A, B, C, D, E e assim por diante) e pelo menos 11 Cdk (Cdk 1 a Cdk 11). Elas atuam em diferentes combinações, em pontos específicos do ciclo.

As Cdk desempenham sua função quinase apenas quando estão associadas às ciclinas, constituindo dímeros; são os complexos ciclina-Cdk. Na ausência de ciclinas, as Cdk são inativas. No dímero, a *Cdk* é a subunidade enzimática com atividade quinase de proteínas e a ciclina, uma proteína regulatória que ativa a capacidade quinase da Cdk para fosforilar proteínas-alvo específicas. Assim, a atividade do complexo ciclina-Cdk é controlada pelo padrão cíclico de acúmulo e degradação da ciclina. A montagem cíclica do dímero ciclina-Cdk, sua ativação e posterior desmontagem são processos centrais que dirigem o ciclo celular.

Em todas as células eucariontes, três momentos do ciclo são estratégicos para seu controle, sendo cada um deles regulado por diferentes classes de ciclinas: as ciclinas de G_1/S (ciclinas E em vertebrados), formam complexos com Cdk no final do G_1 e comprometem a célula com a duplicação de seu DNA; as ciclinas de S (ciclinas A em vertebrados), que se ligam a Cdk no início da fase S e são necessárias para iniciar a duplicação do DNA; as ciclinas de M (ciclinas B em vertebrados), que se complexam com Cdk e promovem os eventos da mitose. A maioria das células expressa mais uma classe de ciclinas, as ciclinas de G_1 (ciclinas D em vertebrados), que promovem a transposição do ponto de restrição R ou *start*, no final do período G_1. Nos vertebrados, essas ciclinas formam quatro diferentes tipos de complexos com diferentes Cdk. As ciclinas D complexam-se com Cdk4 e Cdk6, as E com Cdk2, as ciclinas A com Cdk1 e Cdk2, enquanto as ciclinas B o fazem com Cdk1. Na literatura, esses complexos são referidos, respectivamente, como G_1-Cdk, G_1/S-Cdk, S-Cdk e M-Cdk, nomenclatura utilizada também neste capítulo.

Os diferentes complexos ciclina-Cdk permanecem inativos até que, atingido o estágio do ciclo pelo qual são responsáveis, são ativados. A ativação resulta da fosforilação de um aminoácido específico próximo ao sítio ativo da Cdk, por ação de uma proteína conhecida como *Cak*, quinase ativadora de Cdk

(do inglês *Cdk-activating kinase*). Esta fosforilação causa uma pequena alteração conformacional da Cdk, que aumenta sua eficiência em fosforilar proteínas-alvo importantes no ciclo.

Outro modo de controle da atividade do complexo ciclina-Cdk ocorre pela ação de uma proteinoquinase denominada Wee 1, que fosforila dois aminoácidos presentes no sítio ativo da Cdk, inibindo sua atividade, com consequente inativação do complexo. A atividade do complexo é restaurada pela desfosforilação desses dois aminoácidos por uma fosfatase conhecida como Cdc25. Esta, por sua vez, é ativada quando outra proteína, a polo-quinase (PLK, *polo-like kinase*), fosforila alguns de seus sítios ativos. Além disso, o próprio complexo ciclina-Cdk, que sofreu ativação, também contribui para a fosforilação da Cdc25. O complexo ciclina-Cdk também fosforila e inibe a Wee 1. Assim, por um mecanismo de retroalimentação positivo, o complexo ciclina-Cdk é capaz de ativar seu próprio ativador, ao mesmo tempo em que inibe seu próprio inibidor. Esse processo atua no final do G_2, fazendo com que todos os complexos M-Cdk da célula sejam rapidamente ativados e possam desencadear os eventos que dão início à mitose.

Uma família de proteínas, denominadas proteínas inibidoras de Cdk, do inglês CKI, (Cdk, *inhibitor proteins*), também inativam complexos ciclinas-Cdk. Essas proteínas ligam-se à Cdk, provocando um rearranjo no seu sítio ativo, inativando-a. O processo é revertido quando elas se dissociam da Cdk. Essas proteínas atuam principalmente no controle das fases S e G_1.

Cada um dos diferentes complexos ciclina-Cdk desencadeia e controla um evento específico do ciclo celular. A maneira como esse controle se processa é descrita a seguir e está esquematizada na Figura 9.15.

O controle que os complexos G_1-Cdk e G_1/S-Cdk exercem

O complexo G_1-Cdk é responsável pela decisão da célula de entrar ou não em divisão e é ativado por fatores extracelulares, como será discutido mais adiante, neste capítulo. Na transição de G_1 para S, por outro lado, é ativado o complexo G_1/S-Cdk, que estimula a duplicação do centrossomo e desencadeia a fosforilação de outras proteínas celulares, incluindo as várias enzimas e polimerases que são necessárias para a síntese do DNA, comprometendo a célula a iniciar a fase S.

A ação do complexo S-Cdk

O complexo S-Cdk, ativado no final do G_1, fosforila o complexo ORC (de reconhecimento da origem), visto anteriormente, neste capítulo. A fosforilação e consequente ativação desse complexo desencadeiam a replicação do DNA. Depois de ocorrida a replicação, o S-Cdk promove a dissociação de algumas proteínas presentes no complexo pré-RC (pré-replicativo), o que causa a desmontagem do complexo, garantindo que cada origem de replicação seja lida uma única vez. A atividade do S-Cdk permanece alta durante todo o período G_2 e início da mitose.

Como o complexo M-Cdk controla a mitose

A síntese da ciclina de M aumenta durante todo o período G_2 e início de M, o que causa um rápido aumento dos níveis do complexo M-Cdk. Este complexo permanece inativo até o final do G_2, quando é ativado pela fosfatase Cdc25, tornando-se apto para atuar como proteinoquinase e desencadear os eventos da mitose. No entanto, a própria fosfatase Cdc25 só atua quando é ativada pela quinase PLK, a qual, por sua vez, ainda que se acumule no início da fase G_2, só é fosforilada e, portanto, ativada no final de G_2, imediatamente antes da mitose. Estudos recentes sugerem que esta ativação da PLK se dá com a fosforilação de seu aminoácido Thr210 pela quinase Aurora A, depois que se torna acessível para fosforilação

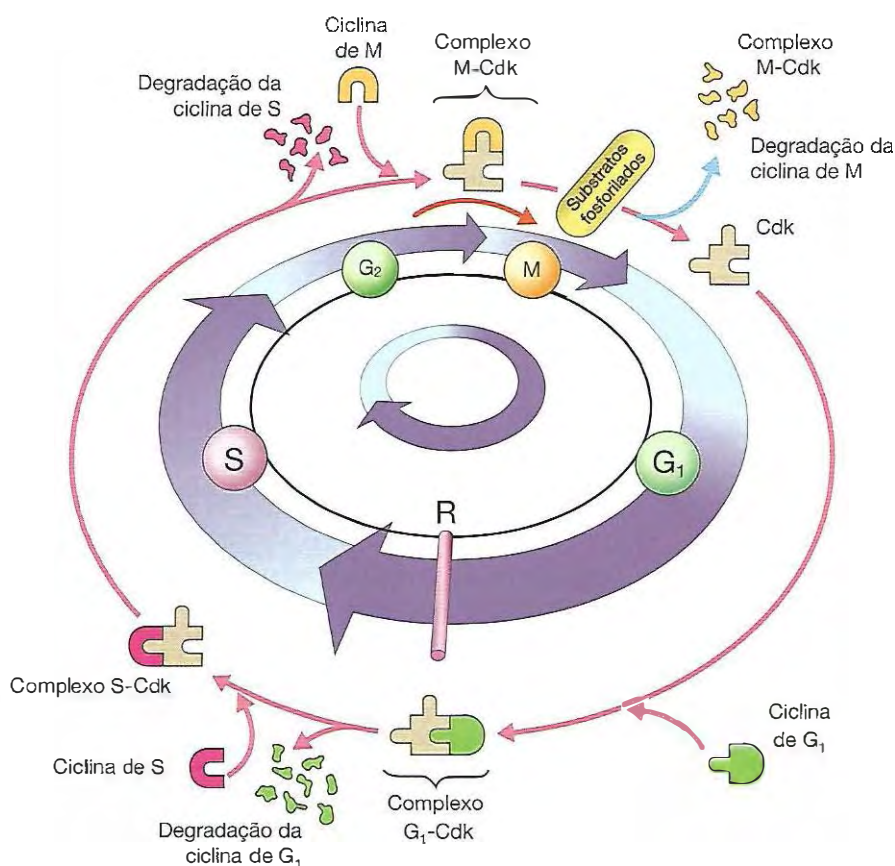



Figura 9.15 ▪ Esquema resumido dos mecanismos que controlam os eventos bioquímicos e celulares do ciclo celular. No início de G_1, a enzima Cdk está dissociada da ciclina e, portanto, inativa. Durante G_1, enquanto a célula cresce, as ciclinas de G_1 se acumulam. Quando alcançam um nível crítico, elas se ligam e ativam a enzima Cdk. O complexo quinase ativado fosforila substratos apropriados necessários para desencadear a síntese de DNA, e, então, as ciclinas de G_1 são degradadas e o complexo quinase desativado. Em G_2, as ciclinas mitóticas se acumulam, ligam-se à enzima Cdk e ativam-na. O complexo M-Cdk ativado fosforila novos substratos, direcionando a célula por meio da mitose. Então, a rápida degradação das ciclinas de M leva à inativação da quinase Cdk, o que dirige a célula para completar a mitose e entrar na intérfase do próximo ciclo celular. Enzimas fosfatases agem, tanto em G_1 como em M, revertendo os efeitos quinase dos complexos ciclina-Cdk.

por intermédio da ligação de outra proteína denominada Bora com a PLK, durante G_2. Assim, em uma reação em cadeia, Bora e Aurora A atuam sinergisticamente na ativação de PLK, o qual, fosforilando Cdc25, promove ação ativadora sobre o complexo M-Cdk, o que inicia a entrada em mitose.

O complexo M-Cdk ativo induz a condensação cromossômica, a fragmentação do envoltório nuclear e a reorganização do citoesqueleto, para a montagem do fuso. No início da mitose, o M-Cdk fosforila proteínas presentes no complexo das condensinas, bem como as histonas H1 e H3, ativando essas proteínas e fazendo com que atuem na condensação cromossômica. A desmontagem do envoltório nuclear, por sua vez, ainda que envolva mudanças em todos os seus componentes, como descrito anteriormente neste capítulo, resulta principalmente da fosforilação de resíduos específicos de serina presentes nas laminas da lâmina nuclear, o que provoca a separação dos filamentos de laminas em dímeros individuais. O M-Cdk fosforila todos os tipos de laminas, levando à desorganização da lâmina nuclear. Em consequência, as membranas nucleares se fragmentam em vesículas, que se dispersam. As laminas, no entanto, não são as únicas proteínas-alvo do M-Cdk nesse processo. A fosforilação de uma ou mais proteínas intrínsecas da membrana nuclear interna tem papel primordial na dissociação de seus componentes.

Ainda na mitose ocorre modificação da dinâmica da arquitetura celular para a formação do aparelho mitótico, quando os componentes do citoesqueleto, como os filamentos de actina e os microtúbulos, são alvos potenciais das enzimas quinases. A desmontagem dos microtúbulos do citoesqueleto ocorre quando o M-Cdk fosforila as MAP (proteínas associadas aos microtúbulos), reduzindo a estabilidade dos microtúbulos. Ao mesmo tempo, fosforila e ativa as catastrofinas, que são proteínas motoras que fazem o desmonte dos microtúbulos. O equilíbrio cíclico entre estas duas atividades do M-Cdk causa, por um lado, o desmonte dos microtúbulos do citoesqueleto e, por outro, a utilização das moléculas de tubulina livres para polimerizar os microtúbulos do fuso de divisão.

Outro evento que envolve a atividade quinase do M-Cdk ocorre na transição da metáfase para a anáfase, quando se dá a separação das cromátides-irmãs, com consequente migração dos cromossomos-filhos. Essa transição é desencadeada quando o M-Cdk ativa uma ligase de proteína-ubiquitina, o complexo promotor de anáfase (em inglês, *anaphase-promoting complex*, APC) ou ciclossomo, responsável por ubiquitinar várias proteínas regulatórias, ou seja, ligar várias moléculas de ubiquitina a proteínas-alvo e, assim, marcá-las para serem degradadas por proteólise nos proteossomos 26S (Capítulo 10). Uma das principais proteínas-alvo do APC é a securina, que inibia inicialmente a proteína separase. Com a destruição da securina, a separase degrada o complexo coesina, que unia as duas cromátides pelos centrômeros-irmãos, causando a sua separação em cromossomos-filhos, os quais migram agora para os polos opostos da célula. Além de ser responsável pela separação das cromátides-irmãs, o complexo APC também liga cadeias de ubiquitina às ciclinas mitóticas, seu outro alvo importante. A consequente degradação da ciclina M inativa o complexo M-Cdk e permite que as fosfatases desfosforilem os muitos substratos das Cdk que haviam sido fosforilados no início da mitose. Isso leva à desmontagem do fuso, à descondensação cromossômica e à restauração do envoltório nuclear e, portanto, leva a célula a sair da mitose e a progredir para a intérfase do próximo ciclo. Assim, os estágios finais da mitose são governados por dois principais mecanismos regulatórios: desfosforilação dos substratos das quinases Cdk e ligação de ubiquitinas aos substratos do APC.

Diversas quinases de proteínas, muito conservadas evolutivamente, continuam sendo detectadas como responsáveis por disparar os mais importantes eventos do ciclo celular. A complexidade e o tamanho da família de quinases revelam que a regulação das funções de proteínas feita por meio da fosforilação reversível, resultante da ação de quinases, é fundamental no controle da progressão do ciclo celular em todas as células eucariontes.

As sofisticadas técnicas atuais de biologia molecular mostram que os genes de quinases de proteínas constituem cerca de 2% de todo o genoma humano.

O ciclo celular é influenciado por fatores de crescimento e outros sinais extracelulares

Como discutido anteriormente neste capítulo, a proliferação das células eucariontes superiores é controlada por várias substâncias que foram denominadas fatores de crescimento. O primeiro desses fatores descoberto foi um peptídio que estimula o crescimento de nervos, mais especificamente produz uma hiperplasia de gânglios simpáticos de embriões de galinha. Esse fator, denominado de fator de crescimento do nervo (NGF – *nerve growth factor*), foi inicialmente extraído de culturas de células de camundongo. Posteriormente, outros fatores peptídicos foram descobertos, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF – *epidermal growth factor*), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF – *fibroblast growth factor*), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – *platelet derived growth factor*) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF – *insulin-like growth factor*).

Em células animais em proliferação, os fatores de crescimento agem fundamentalmente controlando a progressão de G_1-S, impulsionando-as a atravessar o ponto R no final de G_1 e a continuar, então, o ciclo de divisão. Se não forem estimuladas nessa etapa do ciclo, as células são incapazes de passar o ponto R e entram no estágio denominado de G_0, no qual a proliferação é interrompida, tornando-se quiescentes. Por outro lado, as células que estão em G_0, se estimuladas pelos fatores de crescimento, retornam à atividade proliferativa, entrando novamente em ciclo a partir de G_1. Os fatores PDGF e FGF tornam as células em G_0 "competentes" para deixar esse estágio. Na presença de EGF, as células progridem nas primeiras etapas de G_1, e, na presença de IGF, conseguem transpor o ponto de restrição, no final de G_1, tornando-se comprometidas com a divisão. Assim, FGF e PDGF são fatores de competência, enquanto EGF e IGF são fatores de progressão. Eles agem, portanto, sinergisticamente para promover a transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$.

De maneira semelhante, nas células vegetais, o hormônio auxina é o fator de crescimento que controla a progressão de G_1-S. No entanto, diferentemente das células animais, que após a fase S não necessitam de estímulo hormonal para completar o ciclo, nas células vegetais a passagem G_2/M também é controlada por um sinal hormonal. Ao final de G_2, a presença de outro tipo de hormônio, a citocinina, é essencial para a entrada em mitose, pois é ele que estimula a remoção do fosfato da proteína Cdk, promovendo assim a ativação do complexo M-Cdk.

Esse mecanismo de regulação do ciclo celular por fatores de crescimento e de diferenciação extracelulares envolve, logicamente, a ação de receptores de membrana estimulando vias de sinalização intracelulares, que, por sua vez, deverão agir de maneira reguladora sobre as proteínas centrais que fazem o controle do ciclo celular.

Muitos outros fatores, além dos fatores de crescimento, estão envolvidos na regulação do ciclo celular, agindo como sinais inibitórios de proliferação. Estes incluem agentes que danificam o DNA, fatores ambientais adversos ou mesmo contatos celulares. Esses sinais antiproliferativos agem, em geral, pela indução de proteínas que se ligam ao complexo ciclina-Cdk, as já mencionadas inibidoras de Cdk, o que resulta na inatividade do complexo e, portanto, no bloqueio do ciclo. Outros reguladores do ciclo celular incluem as proteínas codificadas pelos chamados genes supressores de tumor que agem, como os próprios inibidores de Cdk, interrompendo a progressão do ciclo e cuja inativação leva ao desenvolvimento de tumores.

A título de exemplo, em alguns tecidos, a atividade mitótica é inibida por substâncias de natureza proteica chamadas calonas. As calonas são normalmente produzidas pelos tecidos, e sua presença impede a proliferação excessiva das células, regulando o ritmo de crescimento dentro dos limites normais. Foi demonstrado que, em casos de extirpação de parte de um órgão, como, por exemplo, do fígado, a produção de calonas específicas diminui, com o consequente aumento das mitoses nas células do fígado. À medida que a regeneração se processa e com o consequente aumento de células, aumenta a produção de calonas e, como resultado, reduz-se paralelamente a proliferação. As calonas provavelmente também explicam o fenômeno chamado hipertrofia compensadora, que foi observado e bem estudado no rim e pelo qual, quando se extirpa um dos órgãos de um par, o outro sofre um processo de crescimento, seguido de um aumento de sua atividade fisiológica.

Assim, observa-se que, em eucariontes, a maquinaria central do ciclo celular é controlada por uma rede de sinalização de pontos de controle (*checkpoints*) que continuamente estão averiguando nas células a existência de aberrações e disparando respostas de reparos que sejam necessários. A dinâmica entre esses dois atores protege os organismos multicelulares da proliferação não programada e do câncer.

Logicamente, deve-se considerar que, em função das diferentes formas de interação dos fatores extracelulares com os diversos controladores internos da proliferação celular, os mecanismos de regulação do ciclo são muito mais complexos do que aqui delineados e não serão objeto de mais detalhamento neste livro.

Resumo

A alternância dos estágios de intérfase e de divisão na vida das células corresponde ao chamado ciclo celular, que é o processo básico de gênese de novas células. Compreende os fenômenos que ocorrem desde a formação de uma célula até sua própria divisão em duas células-filhas. A intérfase representa o período compreendido entre duas divisões. Três fases consecutivas são geralmente descritas na intérfase: G_1, S e G_2. Em G_1, a fase mais variável em duração, as células apresentam intensa atividade de síntese de RNA e de proteínas, e nela ocorre um marcante aumento do citoplasma das células recém-formadas. No período S, a célula duplica seu conteúdo de DNA e seu centrossomo, enquanto em G_2 ocorre discreta síntese de RNA e de proteínas que são essenciais para a mitose. Nesse período, ocorre o acúmulo e a ativação dos complexos ciclina-Cdk, que são reguladores críticos da mitose em todas as células eucariontes. A duplicação do DNA, na fase S, faz-se de modo semiconservativo, ou seja, as cadeias da dupla hélice de DNA se separam, e, a partir de cada uma delas, uma nova cadeia é sintetizada, replicando a molécula original. Nas células eucariontes, essa duplicação inicia-se em numerosos pontos, ao longo da molécula de DNA, e progride até encontrar novas regiões em duplicação. Esses segmentos, ou unidades de replicação, são denominados de réplicons. Em cada réplicon, a cadeia nascente é iniciada por um curto segmento nucleotídico de RNA, chamado primer de RNA, que, ao final, é removido e substituído por um segmento de DNA. Tendo passado pelas fases da intérfase, o núcleo entra em um processo de divisão ou mitose. A mitose é dividida, didaticamente, em fases que descrevem as principais alterações morfológicas e a movimentação dos cromossomos durante o processo. Na prófase, os cromossomos iniciam seu processo de condensação, os nucléolos desorganizam-se e formam-se feixes de microtúbulos a partir dos centrossomos, constituindo o fuso mitótico. A fragmentação do envoltório nuclear marca o final da prófase, quando se estabelece o contato entre microtúbulos e os cinetócoros. Na metáfase, a condensação cromossômica atinge o maior grau, os cromossomos dispõem-se em uma placa na região equatorial da célula, presos a microtúbulos do fuso e por eles ligados aos polos opostos da célula. Na fase seguinte, anáfase, os centrômeros de cada cromossomo se separam, e as cromátides-irmãs (agora cromossomos-filhos) são movidas para os polos opostos, com a participação das fibras do fuso e de proteínas motoras. Na telófase, os cromossomos-filhos chegam aos polos, e ocorre a reconstituição dos núcleos, com a descondensação dos cromossomos, a reorganização dos nucléolos e a desagregação do fuso mitótico. Após a reconstituição dos núcleos-filhos, completa-se a divisão do citoplasma (citocinese), originando, assim, duas células-filhas independentes. A duração do ciclo celular é variável quando se consideram células de diferentes tecidos de um organismo,

ou quando se consideram espécies diferentes. Em um mesmo organismo, a principal causa dessa variação é a duração do período inicial da intérfase: o G_1. As fases S e G_2 e a própria mitose têm duração mais ou menos constante para as células de diferentes tecidos de uma mesma espécie. Tecidos proliferativos apresentam células com ciclo celular curto, ao contrário de tecidos não proliferativos, cujas células apresentam ciclo celular longo. Essas variações são influenciadas por fatores extracelulares chamados fatores de crescimento, os quais, quando presentes, induzem as células a entrar nas etapas de G_1 que as conduzem, inexoravelmente, às fases S, G_2 e à mitose. Também existem certas substâncias que são inibidoras da atividade mitótica. A proliferação, no entanto, é rigorosamente controlada por produtos gênicos, em especial os complexos ciclina-Cdk, responsáveis pela regulação das funções de proteínas celulares envolvidas com eventos do ciclo celular, sobre as quais atuam, principalmente, efetuando fosforilações e desfosforilações reversíveis, e, desse modo, controlando a passagem por pontos cruciais de avanço do ciclo celular.

Meiose | A meiose torna possível a reprodução sexuada

O ciclo de divisão de células somáticas, discutido até agora neste capítulo, resulta na produção de duas células-filhas geneticamente idênticas e que apresentam o mesmo número de cromossomos que a célula que lhes deu origem. Estas são células diploides (2n), considerando-se que o número básico de cromossomos de uma espécie (ploidia) seja igual a n. Entretanto, não é isso que ocorre com as células germinativas, localizadas nas gônadas de organismos animais ou vegetais que se reproduzem sexualmente e que dão origem às células sexuais ou gametas/esporos. O processo de formação dos gametas, denominado gametogênese, resulta da divisão de uma célula germinativa diploide em células haploides (n), ou seja, células que recebem apenas um cromossomo de cada par de homólogos e que apresentam, então, só a metade do número de cromossomos encontrado nas células somáticas da espécie. Além disso, por características próprias, o processo resulta na formação de quatro células geneticamente diferentes entre si e diferentes da célula-mãe. Esse tipo especial de divisão que reduz à metade o número de cromossomos recebeu o nome de meiose (do grego *meion*, redução). Posteriormente, com o auxílio da citofotometria, observou-se, como era de supor, que os gametas contêm também a metade do teor de DNA (C), característico e constante de cada espécie. Esta redução de número cromossômico e teor de DNA é compensada pelo posterior processo de fertilização dos gametas. Para que ocorra a redução do número cromossômico, é necessário que aconteçam duas divisões celulares sucessivas (as quais são chamadas de meiose I e meiose II) após uma única duplicação do DNA, que deve ocorrer durante o período S anterior à primeira divisão (Figuras 9.16 e 9.17).

O período S, de síntese de DNA, que precede a meiose geralmente tem duração mais longa do que o período S que precede a mitose, embora, em ambas as situações, o teor de DNA seja duplicado de 2C para 4C. Por exemplo, em trigo, a fase S pré-meiótica dura ao menos 8 h a 20°C, comparada com o período S de aproximadamente 3 h nos ciclos somáticos. Em Lilium, a duração chega a ser de 50 h, enquanto a fase S somática é de 8 h, nas mesmas condições ambientais. Esse alongamento do período S pré-meiótico parece estar relacionado com uma frequência reduzida de origens de replicação. Uma característica comum com a fase S pré-mitótica é a duplicação precoce da eucromatina e tardia da heterocromatina dentro do período S pré-meiótico. Entretanto, os núcleos pré-meióticos em S apresentam 2 a 3 vezes mais heterocromatina que os núcleos somáticos, o que pode ter papel importante no controle de eventos das etapas iniciais da meiose. Essas etapas iniciais, incluídas na meiose I, encerram eventos muito diferentes daqueles do início da mitose. Com exceção desses acontecimentos característicos do período inicial da meiose, que virão descritos a seguir, os demais eventos da meiose são muito similares aos da mitose, sejam eles citoplasmáticos, como a montagem e a desmontagem do fuso, ou nucleares, como a desorganização e a reorganização do núcleo. Para facilidade de estudo, então, cada divisão meiótica (I ou II), à semelhança da mitose, é dividida nas fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 9.16).

O processo de meiose

A prófase da primeira divisão meiótica, ou prófase I, é um período exageradamente demorado, em comparação com a prófase da mitose. Como exemplo, pode-se observar a longa duração da formação de gametas na espécie humana (ovogênese, na mulher, e espermatogênese, no homem). No caso feminino, a meiose se inicia nas células da linhagem germinativa (ovogônias), no folículo primário dos ovários ainda durante a fase embrionária do desenvolvimento, de maneira que, no quinto mês de vida intrauterina, todos os ovócitos que serão formados pela mulher, aproximadamente 1 milhão de células, já se encontram na prófase I da meiose. Essas células pré-gaméticas permanecem em prófase I (em uma fase específica denominada diplóteno) por vários anos, pelo menos até a fase de maturidade sexual (puberdade), que se dá por volta dos 12 anos de idade, ou até os 45 a 50 anos de idade. Nessa fase da vida, 20 a 30 dessas células, a cada mês e imediatamente antes da ovulação, completam a meiose I e chegam até a metade da segunda divisão meiótica (metáfase II), quando recebem o nome de ovócitos II. Então, se a célula for fecundada, termina o processo meiótico; caso não seja, ela degenera e é eliminada através do sangramento mensal (ou menstruação). A meiose I dá origem a duas células: o ovócito secundário e o primeiro corpúsculo polar, que apresentam tamanhos diferentes. O corpúsculo polar logo degenera e o ovócito II é que segue a meiose II, ao final da qual é formado o segundo corpúsculo polar, que também degenera. Na espermatogênese, a prófase I também é muito mais lenta que a prófase da mitose. No entanto, diferente do que ocorre na mulher, o início da meiose nos túbulos seminíferos dos testículos para formação de espermatozoides

Meiose I

A B C D

E F G H

Meiose II

I J K

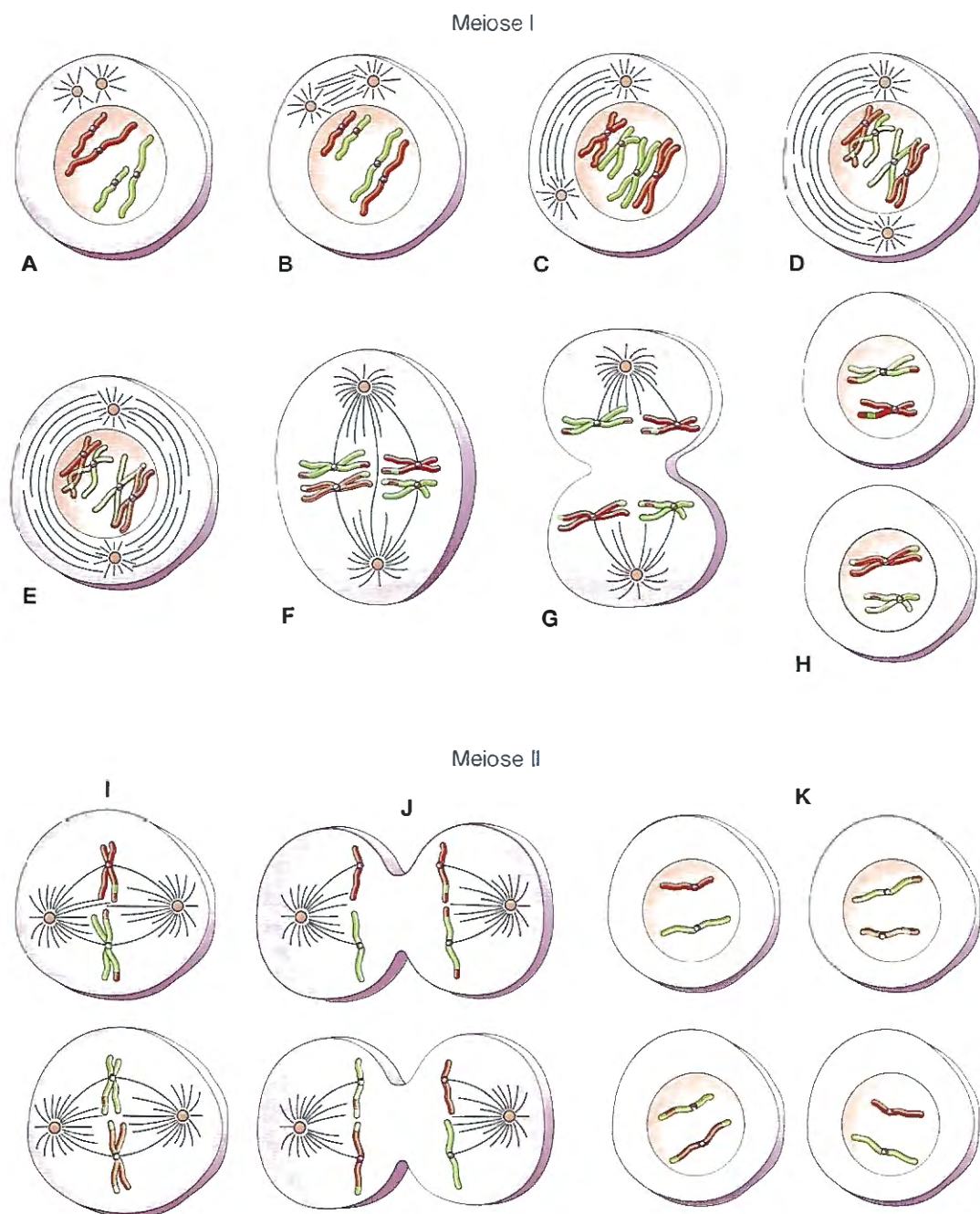



Figura 9.16 ▪ Diagrama geral ilustrativo da meiose em uma célula hipotética, com dois pares de cromossomos (2n = 4). De **A** a **H**, representa-se a primeira divisão meiótica, antes da qual já ocorreu a síntese de DNA. As células representadas de **A** a **E** estão na prófase I, especificamente em leptóteno (**A**), zigóteno (**B**), paquíteno (**C**), diplóteno (**D**) e diacinese (**E**). Cada uma das duas células H, derivadas da meiose I, tem número diploide (2n) de cromossomos e quantidade 2C de DNA. Essas duas células entram em meiose II, representada de **I** a **K**. Como não ocorre nova síntese de DNA antes dessa divisão, as quatro células indicadas pela letra **K**, resultantes da meiose, são haploides (n) e apresentam um conteúdo de DNA igual a C. Observe que, durante a meiose I, houve troca de segmentos entre cromossomos homólogos e que esse fato, associado à segregação desses cromossomos de maneira independente entre eles, contribui para a grande variabilidade genética dos seres de reprodução sexuada.

se dá apenas na puberdade, por volta dos 12 anos de idade, e permanece por toda a vida. Em 24 dias, as células terminam a meiose I com o mesmo tamanho, ocupando 13 a 14 dias apenas com a prófase I, os quais contrastam muito com o curto tempo, de cerca de 8 h, gasto com a meiose II. Nesse processo, mais cerca de 40 dias são usados ainda para a diferenciação e a maturação das células resultantes da meiose em espermatozoides.

O período de prófase I é, portanto, o mais demorado de toda a meiose, que já é um processo muito mais lento do que a mitose. Essa demora ocorre porque, durante a prófase I, ocorre o evento-chave da meiose: o pareamento dos cromossomos homólogos. Esse pareamento, exclusivo da meiose, tem dupla importância: (a) garante a posterior disjunção apropriada dos cromossomos homólogos, que se segregam um do outro de tal maneira que ambos os núcleos-filhos dessa divisão recebam um membro de cada par de cromossomos; e (b) permite que ocorram trocas de segmentos entre os cromossomos homólogos de origem paterna e materna, fenômeno este chamado de recombinação genética, permuta ou *crossing-over* (Figura 9.17A). Ambos os fenômenos têm grande importância para as espécies, por contribuírem com uma maior diversidade genética para o processo evolutivo, o que voltará a ser

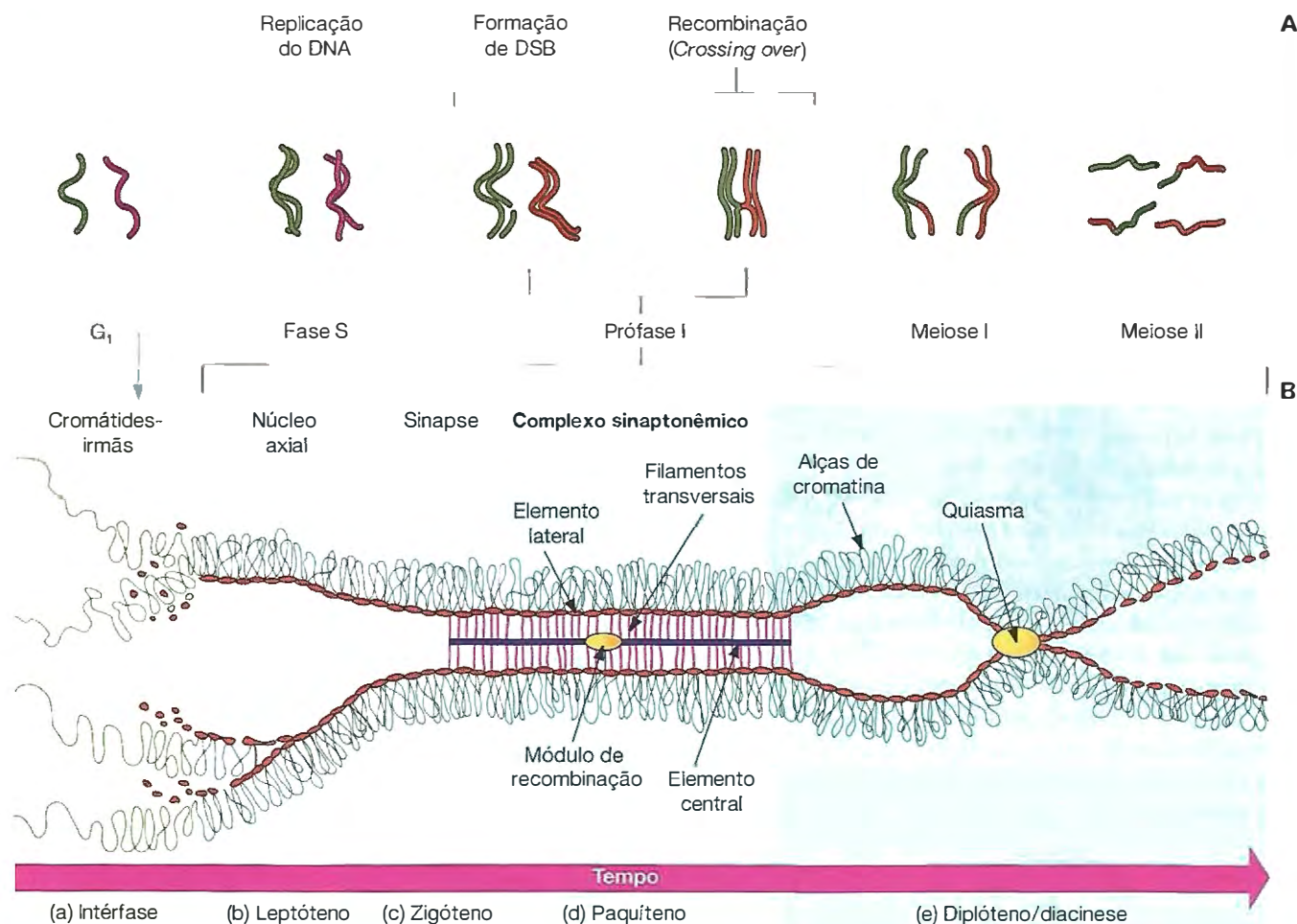



Figura 9.17 ▪ Esquema representativo da sucessão dos principais eventos da meiose. **A.** No estágio G_1 está representada uma célula diploide com um par de cromossomos homólogos, cujo DNA é replicado na fase S, o que produz duas cromátides-irmãs em cada cromossomo. Após a replicação, na prófase, são produzidas quebras de cadeias duplas (DSB), as quais são então reparadas por recombinação. Os quiasmas resultantes conectam os cromossomos homólogos e facilitam a adequada segregação dos homólogos na primeira divisão meiótica (meiose I). As cromátides-irmãs são segregadas na meiose II. **B.** Detalhes dos eventos de montagem e desmontagem do complexo sinaptonêmico que ocorrem durante os estágios da prófase I (b–d) da meiose.

abordado mais adiante neste capítulo. Por ser uma fase longa, a prófase I é subdividida nas seguintes fases: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (Figura 9.17B).

No leptóteno, a cromatina começa a se condensar gradualmente em cromossomos, mas somente filamentos finos são ainda visíveis ao microscópio óptico. Daí surgiu o nome da fase, uma vez que *leptos*, grego, significa delgado, e *tainia*, filamento ou fita. Ao microscópio óptico, são característicos dessa fase pontos de maior condensação ao longo dos filamentos cromatínicos chamados de cromômeros, que ocorrem na mesma posição nos dois cromossomos de um par de homólogos. Embora se saiba, pela citofotometria e pela radioautografia, que os cromossomos já duplicaram nessa etapa, o microscópio óptico não mostra essa duplicação, pois não são visíveis as duas cromátides que formam cada um desses cromossomos; porém, elas são claramente reveladas pela microscopia eletrônica. Ao nível ultraestrutural ainda, observa-se que os cromossomos estão individualmente associados a estruturas filamentosas localizadas entre as duas cromátides-irmãs de cada cromossomo. Estas são denominadas núcleos axiais e irão tornar-se, mais tarde, os elementos laterais do complexo sinaptonêmico (Figura 9.17B.b). As duas extremidades do núcleo axial de um cromossomo estão ligadas ao envoltório nuclear e, frequentemente, em alguns organismos, podem prender-se ao envoltório em pontos muito próximos entre si, dando aos cromossomos uma orientação definida dentro do núcleo, denominada disposição em buquê, que, às vezes, pode ser vista apenas no estágio seguinte.

Gradativamente, os cromossomos continuam sua condensação e se inicia um processo de aproximação e pareamento entre os homólogos, chamado sinapse, que tem sido comparado à união das duas metades quando se fecha um zíper. O início do processo sináptico ocorre na fase denominada zigóteno (do grego *zygós*, laço, união), que é a segunda fase da prófase I. A sinapse ocorre ordenadamente, ponto por ponto, ou seja, cromômero por cromômero, aproximando os cromossomos homólogos, que se alinham lateralmente de uma maneira precisa, mas não se fundem, permanecendo entre eles uma distância final de cerca de 150 a 200 nm. A microscopia eletrônica mostrou que as sinapses cromossômicas são devidas à formação de uma estrutura proteica complexa, que se dispõe longitudinalmente entre os dois homólogos, denominada complexo sinaptonêmico (CS) (Figura 9.17B.c). Ao microscópio eletrônico, observa-se que ele é constituído por três componentes elétron-densos, paralalelos entre si e ao eixo do cromossomo, sendo dois elementos laterais e um elemento

central (Figura 9.17B.d). Cada elemento lateral, anteriormente chamado de núcleo axial, está em contato com a cromatina de um dos cromossomos homólogos e é conectado ao outro elemento lateral por proteínas conhecidas como filamentos transversais do elemento central, o qual se associa nessa fase. Assim se estabelece a união entre os cromossomos do par de homólogos. Os elementos laterais têm importante papel na condensação e no pareamento cromossômicos, na montagem dos filamentos transversais e evitando que quebras de cadeia dupla (DSB – do inglês *double-strand breaks*) levem à recombinação entre cromátides-irmãs, mas, sim, que elas resultem em permuta meiótica recíproca.

Quando o processo de formação sinaptonêmica se completa, isto é, quando todos os homólogos estão unidos por complexos sinaptonêmicos em toda a sua extensão, começa a terceira fase da prófase I, que é o paquíteno, durante a qual os cromossomos permanecem emparelhados (Figura 9.17B.d). O conjunto constituído pelos cromossomos homólogos unidos pelo complexo sinaptonêmico é chamado de bivalente ou tétrade; bivalente porque contém dois cromossomos unidos, os homólogos, e tétrade porque é formado pelas quatro cromátides. Os cromossomos em figura de tétrade aparecem então muito espessos ao microscópio óptico, o que inspirou o nome da fase (do grego *pachys*, espesso). Essa organização dos bivalentes assegura que regiões homólogas do DNA sejam colocadas em proximidade, de tal modo que é favorecida a ocorrência de um segundo evento de grande importância na meiose: a troca de segmentos de DNA entre os cromossomos homólogos, denominada permuta, *crossing-over* ou recombinação genética. A permuta é um evento molecular que envolve troca de genes entre os cromossomos de origem paterna e materna. É um evento controlado de maneira a garantir que se forme pelo menos um em cada par de cromossomos e que, se forem múltiplos no mesmo par, não ocorram simultaneamente em regiões adjacentes, mas sejam espaçados. Esta recombinação homóloga se inicia com a formação de quebras de cadeia dupla do DNA (DSB) geradas pela proteína Spo11, que age com ajuda de várias outras proteínas acessórias cujos papéis ainda não são bem conhecidos (Figura 9.17A). O papel da Spo11 em gerar as lesões que iniciam a recombinação meiótica é evolutivamente muito conservado, ocorrendo de leveduras a plantas e mamíferos. Com a ocorrência das DSB, algumas dão origem à reunião trocada dos filamentos provenientes de cada uma das cromátides homólogas envolvidas na permuta, seguida por um processo de reparo por meio da substituição de bases impropriamente pareadas nas duas moléculas de DNA híbridas. Várias observações mostram claramente que o pareamento com a formação do complexo sinaptonêmico é um requisito para a permuta, mas que a presença do complexo não é condição suficiente para que ela ocorra. Estruturas elétron-densas, geralmente de forma esférica ou elíptica, medindo entre 30 e 150 nm de diâmetro e dispostas ao acaso são observadas ao microscópio eletrônico, nessa fase, em íntima associação com a região central do complexo sinaptonêmico. São os nódulos de recombinação e estariam, provavelmente, relacionadas com a recombinação genética (Figura 9.17B.d). Estudos em vários organismos mostram uma correlação entre o número e a distribuição dos nódulos de recombinação com o número e a distribuição de permutas. Essa íntima relação é reforçada pela observação de que, na meiose de organismos em que não ocorre permuta, também não são detectados nódulos de recombinação. Eles poderiam ter a função de fornecer a maquinaria estrutural e enzimática requerida para realização da permuta. Em função dos acontecimentos que encerra, o paquíteno dura alguns dias ou semanas, ao contrário das fases anteriores, o leptóteno e o zigóteno, que são mais breves e ocorrem em apenas algumas horas.

No diplóteno (do grego *diploos*, duplo), denominação da fase seguinte, a maior parte do complexo sinaptonêmico é removida do bivalente e observa-se um início de separação entre os cromossomos homólogos, que passam a ser observados individualmente. Essa separação não chega a ser completa, porque persistem vestígios ou fragmentos do complexo sinaptonêmico em certos locais denominados quiasmas (do grego *chiasma*, disposição em cruz), nos quais os cromossomos homólogos permanecem ligados (Figura 9.17B.e). Os quiasmas podem ser os locais em que, na fase de paquíteno, ocorreu troca de genes entre os cromossomos homólogos. Embora a relação entre quiasma e troca de DNA não seja absoluta, os quiasmas são considerados a evidência citológica do *crossing-over*, já que eles revelam, ao microscópio óptico, no qual anteriormente ocorreu um evento molecular não visível microscopicamente. Recentemente, no ano 2005, evidenciou-se que a proteína coesina age na ligação do quiasma, estabilizando esses locais de troca até a anáfase I. Na formação dos ovócitos, o diplóteno é uma fase muito longa e nela ocorre um aumento de volume celular. Trata-se, portanto, de uma fase de intensa atividade metabólica, o que explica a observação de que, no diplóteno da maioria das espécies, os cromossomos se tornam descompactados para permitir a transcrição de certos genes. Essa descompactação é mais pronunciada em diversas espécies de grupos filogenéticos, como peixes, anfíbios, répteis e aves, nas quais os espermatócitos e ovócitos apresentam cromossomos com uma configuração muito característica, denominados cromossomos plumosos (Capítulo 8).

A última fase da prófase I chama-se diacinese (do grego *dia*, através, e *kinesis*, movimento) e caracteriza-se pelo aumento da repulsão entre os cromossomos homólogos. Esse afastamento leva à chamada terminalização dos quiasmas, fenômeno que consiste em um deslocamento dos quiasmas para as extremidades dos cromossomos à medida que a separação aumenta, o que justifica o nome conferido à fase. No entanto, durante a diacinese, os quiasmas são mantidos, o que é importante para a distribuição correta dos cromossomos durante a migração em anáfase. A falta de quiasmas, ou seja, a falta de conexões físicas resultantes de *crossing-over* entre os homólogos, pode levar a uma segregação incorreta dos cromossomos homólogos ou a sua não disjunção, resultando em produtos meióticos com falta ou excesso de cromossomos, o que causa doenças hereditárias, tal como a síndrome de Down. Tem-se postulado também que o processo de envelhecimento leva à perda da proteína coesina e, consequentemente, ao enfraquecimento da coesão, o que favorece uma separação prematura das cromátides-irmãs. Este parece ser o principal mecanismo de não disjunção e de aneuploidias relacionadas com a idade, em humanos. A diacinese compreende ainda uma preparação para a etapa seguinte da divisão meiótica, que é a metáfase I. Durante a diacinese acontecem: um marcante aumento da

condensação cromossômica, o desaparecimento dos nucléolos, a ruptura do envoltório nuclear, a ligação de cada cromossomo do par de homólogos às fibras do fuso, que os prendem aos polos opostos da célula, e o movimento dos cromossomos para a placa equatorial da metáfase I.

Durante as etapas seguintes da meiose I, a metáfase I, a anáfase I e a telófase I, cada cromossomo continua duplo, isto é, com duas cromátides (Figura 9.16). Na metáfase I, os dois cromossomos homólogos se dispõem na placa equatorial lado a lado, em função do recente término do pareamento entre eles, da manutenção dos quiasmas e também porque, de maneira mais complexa que na mitose, até essa fase a proteína coesina persiste não somente no centrômero, mas também ao longo dos braços cromossômicos. Na placa equatorial dessa metáfase I, cada cromossomo do par de homólogos liga-se aos polos opostos da célula (biorientação) e se dispõe com seus dois cinetócoros voltados para o mesmo polo (coorientação). Essa disposição assegura a disjunção dos cromossomos homólogos, com uma distribuição de cromossomos paternos e maternos (na maior parte das vezes carregando segmentos trocados) para os polos opostos. Esse tipo de segregação ocorre porque, na anáfase I, são seletivamente removidas apenas as moléculas de coesina ligadas aos braços cromossômicos. Aquelas da região centromérica não são destruídas em função da ação de um protetor da coesina, específico da meiose, chamado shugoshina, que inibe a fosforilação da coesina e a sua clivagem. Assim, é fácil ver, durante a anáfase I, que os cromossomos em movimento para os polos celulares são constituídos por duas cromátides, unidas por seus centrômeros. Portanto, na anáfase I, as cromátides-irmãs de cada cromossomo migram juntas para o mesmo polo da célula. O término da primeira divisão meiótica, em ovócitos de vertebrados, é marcado pela extrusão do primeiro corpúsculo polar.

O estágio entre as duas divisões meióticas é chamado intercinese, e, nessa fase, não ocorre nova síntese de DNA, mesmo que na telófase precedente tenha ocorrido completa descondensação cromossômica e reorganização dos dois núcleos-filhos. Assim, por ser desprovida de um período S, essa intercinese não se caracteriza como uma intérfase típica. As duas células na intercinese, resultantes da primeira divisão meiótica, são marcadas pela presença de um número haploide de cromossomos (n) e de uma quantidade 2C de DNA, já que cada cromossomo ainda é duplo. Diz-se, portanto, que a meiose I é uma divisão reducional.

Em seguida, ocorre a segunda divisão meiótica, que se assemelha a uma mitose normal (Figura 9.16). Esta é uma divisão equacional do material genético, em que haverá uma distribuição equitativa do conteúdo de DNA entre os núcleos-filhos. Após uma nova etapa de prófase, em que sempre é necessária uma nova montagem do fuso, as células entram em metáfase, dispondo os cromossomos na região equatorial. Na metáfase II, diferentemente da metáfase I, são os cinetócoros das cromátides-irmãs que se orientam para polos opostos da célula, prendendo-se às fibras do fuso de lados contrários. Assim, na anáfase II, ocorre a disjunção das cromátides-irmãs, que migram para os polos opostos da célula. Na telófase II, última etapa da segunda divisão meiótica, ocorre a citocinese, que dá origem a quatro células, cada uma com número haploide de cromossomos (n) e com quantidade C de DNA (Figura 9.17).

Controle genético da meiose

Assim como a mitose das células somáticas, a meiose é controlada pelo complexo ciclina-Cdk (discutido anteriormente neste capítulo), o qual foi, inclusive, descoberto e purificado a partir de ovócitos de rã. Essas células pré-gaméticas passaram a ser, então, um modelo de estudo da regulação tanto da meiose como do próprio ciclo celular.

Para que a meiose seja bem-sucedida, múltiplos eventos tais como replicação, recombinação e segregação cromossômica devem ocorrer de maneira coordenada e sob uma ordem estreitamente regulada. Hoje, sabe-se que a quinase dependente de ciclina-da-fase S, que dá início à replicação (S-Cdk), é também essencial para iniciar a recombinação meiótica, uma vez que ela fosforila a proteína Mer 2, que é a proteína envolvida com quebras de cadeia dupla (DSB) específicas da meiose. Esta ação prepara a Mer 2 para outra fosforilação subsequente, feita por outra quinase, o que modula interações da Mer 2 com Spo11 e outras proteínas requeridas para a formação das DSB. A colaboração entre estas duas quinases parece ser um mecanismo comum de regulação de eventos da meiose, o que ajudaria a coordenar um em relação ao outro.

Em especial, a meiose de ovócitos é regulada em dois pontos: um, no estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica, em que os ovócitos se detêm por longos períodos de tempo, e outro, em metáfase II, em que permanecem até a fecundação, como já foi explicado.

Na maioria dos vertebrados, os ovócitos deixam o estágio de diplóteno, prosseguindo pelas demais etapas da meiose I, em resposta a estímulos hormonais. Esse sinal hormonal ativa o complexo M-Cdk, que passa a desencadear, à semelhança do que ocorre na transição G_2/M do ciclo mitótico, os eventos de condensação cromossômica, ruptura do envoltório nuclear e formação do fuso. No início da anáfase I, o complexo promotor de anáfase (APC) promove a degradação da securina, que vinha até esta fase inativando a separase, uma proteína com atividade proteolítica, responsável pela clivagem de uma das subunidades da coesina, a Scc1. Assim, dispara-se a remoção seletiva da coesina dos braços cromossômicos. Isso permite que os homólogos materno e paterno sejam segregados sem perda de coesão entre as cromátides-irmãs. O complexo promotor de anáfase (APC) ativa também, assim como na mitose, o sistema proteolítico que degrada a ciclina, o que leva à transição de metáfase para anáfase I e resulta na inativação do complexo M-Cdk. Estudos recentes sugerem que a separase tem uma segunda função não proteolítica. Ela se complexa com a Cdk do complexo ciclina-Cdk e essa interação inibe mutuamente as atividades protease e quinase de cada uma, o que promove a extrusão do primeiro corpúsculo polar, sinalizando o término da meiose I. Isso demonstra que a separase pode ser necessária não só para a segregação cromossômica, mas também para eventos que levam ao término da meiose I.

Depois da citocinese, o complexo quinase M-Cdk volta a apresentar atividade, que se mantém até a metáfase II. Nessa fase, entretanto, o mecanismo regulatório do complexo M-Cdk apresenta características próprias da meiose. Essa regulação age no sentido de manter a atividade do complexo M-Cdk, evitando a proteólise da ciclina e, consequentemente, a inati-

vação do complexo, o que seria esperado nessa fase. Com isso, não ocorre a transição metáfase/anáfase II e a célula fica detida na metáfase II. O fator responsável por essa interrupção em metáfase II foi identificado como um fator citoplasmático, que, por ter sido também capaz de interromper metáfases mitóticas, foi denominado fator citostático. Mais recentemente, um componente essencial desse fator foi identificado como sendo uma proteinoquinase, conhecida como Mos. Essa quinase é responsável, de uma maneira indireta, pela inibição da via proteolítica que leva à degradação da ciclina, interrompendo a meiose na metáfase II. Se o ovócito for fecundado, ocorre um aumento do nível citosólico de Ca^{2+}, responsável pela ativação de um sistema proteolítico que degrada tanto a ciclina como a Mos, o que resulta, finalmente, na inativação do complexo M-Cdk e na complementação da segunda divisão meiótica.

Ainda, tanto a meiose dos ovócitos quanto dos gametas masculinos sofre um controle adicional no período de intercinese, entre a meiose I e a meiose II. O período de intercinese tem duração variável entre os mais diversos organismos, sendo, inclusive, ausente em alguns deles. A característica marcante da intercinese é a ausência da fase S, ou seja, a não ocorrência da replicação do DNA, uma vez que cada cromossomo ainda está duplicado. Para garantir que a fase S seja suprimida e a célula passe da meiose I para a meiose II, os níveis de Cdk e de ciclina M devem ser reduzidos à metade. Isso é garantido tanto pelo aumento na síntese, quanto pela inibição parcial da degradação da ciclina M. A proteinoquinase Mos está envolvida também nesse processo, uma vez que ela ativa a proteinoquinase ativada por mitógeno (em inglês, *MAP-kinase*), responsável pela ativação dos genes que codificam ciclinas e ativa a proteinoquinase RsK. A RsK fosforila proteínas do complexo APC, inibindo parcialmente sua atividade na degradação da ciclina M. Este processo garante que sejam mantidos níveis tais do complexo M-Cdk que impedem nova replicação do DNA.

A meiose favorece a evolução das espécies

A principal característica da meiose é ser um tipo especial de divisão celular que permite aos cromossomos homólogos, presentes na célula original, emparelharem-se intimamente e efetuarem um intercâmbio de material hereditário (*crossing-over*). A troca física real de segmentos de DNA entre os cromossomos materno e paterno de um par de homólogos resulta em uma mistura dos genes parentais, o que leva, por sua vez, a um significativo aumento das combinações genéticas. Com essa maior recombinação gênica, ocorre uma maior variabilidade dos tipos de gametas formados ao final de cada meiose, o que contribui com uma mais alta diversidade de organismos e favorece a maior adaptação evolutiva da espécie. Em última análise, o processo de recombinação genética acelera o processo evolutivo das espécies.

Embora o *crossing-over* aparentemente seja o único evento-chave da meiose que resulta em variabilidade genética, existe um segundo fator ainda mais importante que esse: é a segregação independente dos cromossomos homólogos, que ocorre durante a anáfase I. Em função da possibilidade de cromossomos homólogos migrarem para qualquer dos polos da célula, independentemente de sua origem ser paterna ou materna, e pelo fato de cada um dos homólogos poder dirigir-se para um polo de maneira independente dos demais cromossomos, surgem muitas possibilidades de combinações cromossômicas em cada célula-filha resultante da primeira divisão meiótica. O número possível de combinações cromossômicas, ou de tipos diferentes de gametas que podem ser formados a partir de uma célula-mãe, é sempre igual a 2^n, sendo n o número haploide de cromossomos da espécie, ou o número de pares cromossômicos por núcleo. Exemplificando, a meiose de uma célula com três (3) pares de cromossomos poderia resultar em 8 (2^3) tipos diferentes de gametas, mesmo na ausência de qualquer permuta ou recombinação genética nessa divisão. Da mesma maneira, na espécie humana, tendo em conta o seu n característico, aproximadamente 8×10^6 gametas geneticamente únicos poderiam ser formados a partir de uma única célula. Entretanto, em função de recombinações possíveis, o número de gametas geneticamente distintos que se produz é ainda muito maior.

Não resta dúvida, portanto, de que a principal consequência da meiose é conferir às espécies uma grande diversidade durante o processo evolutivo, lhes assegurando a reprodução sexual.

Resumo

As células da linhagem germinativa multiplicam-se por divisões mitóticas de modo semelhante às células somáticas. No entanto, quando entram nos processos da gametogênese, etapa final de seu programa de desenvolvimento, a divisão adquire aspectos especiais. Essa divisão, a meiose, consiste basicamente em duas divisões nucleares, com síntese de DNA apenas uma vez, antes da primeira divisão. As células-filhas resultantes têm a metade do número de cromossomos e a metade da quantidade de DNA que as células-mães. A prófase meiótica da primeira divisão é especial, pois nela ocorre o emparelhamento dos cromossomos homólogos que podem trocar pedaços entre si, fenômeno denominado de permuta, recombinação ou *crossing-over*. Os cromossomos homólogos permanecem unidos em alguns pontos (quiasmas), resultantes das trocas havidas na permuta, até a metáfase. Na anáfase, como não ocorre divisão dos centrômeros, as duas cromátides que constituem cada cromossomo se mantêm unidas. Com isso, há redução do número de cromossomos por célula, embora a quantidade de DNA seja igual ao valor original (2C), pois cada cromossomo está duplicado. A segunda divisão ocorre geralmente logo após o final da telófase da primeira divisão e é semelhante a uma mitose, com separação das cromátides-irmãs após separação dos centrômeros. Assim, cada célula-filha terá metade do número de cromossomos e, também, a metade da quantidade de DNA que existia na

célula-mãe. Um sistema de controle genético semelhante ao que ocorre na mitose opera também regulando a meiose em dois pontos específicos: no diplóteno da prófase I e na metáfase II. O desbloqueio dessas fases depende, respectivamente, de estímulo hormonal e da degradação dependente de Ca^{++} de uma quinase específica de ovócitos, responsável pela manutenção do complexo ciclina-Cdk ativo. A meiose, formando células com metade do número de cromossomos típico da espécie, permite que, com a união dos gametas haploides (n), se restabeleça, nos novos indivíduos, o número diploide (2n) de cromossomos característico da espécie. A mistura de cromossomos paternos e maternos que ocorre durante a primeira divisão meiótica e, também, a troca de genes na permuta aumentam a variabilidade genética dos indivíduos nas populações. A existência de variabilidade genética é um dos requisitos fundamentais para que ocorra evolução.

Bibliografia

Alberts, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell, 4th ed. Garland, 2002.
Anderson, D.J. e Hertzer, M.W. The life cycle of the metazoan nuclear envelope. Curr Opin Cell Biol, **20**:1, 2008.
Ashkenazi, A. e Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. Science, **281**:1305, 1998.
Boisvert, F.M. *et al.* The multifunctional nucleolus. Nature Reviews: Molecular Cell Biology, **8**: 574, 2007.
Cooper, G.M. The Cell: A Molecular Approach. Sinauer, 1997.
Garrett, R.H. e Grisham, C.M. Biochemistry. Saunders College Publishing, 1995.
Glover, D.M., Ohkura, H. e Tavares, A. Polo kinase: The choreographer of the mitotic stage? The Journal of Cell Biology, **135**:1681, 1996.
Goodman, S.R. Medical Cell Biology. J.B. Lippincott Company, 1994.
Green, D.R. e Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. Science, 281:1309, 1998.
Murray, A.W. The genetics of cell cycle checkpoints. Current Opinion in Genetics and Development, 5:5, 1995.
Murray, A.W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell, **116**:221-234, 2004.
Nelson, D.L. e Cox, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry, 4th ed. W. H. Freeman and Company, 2004.
Nurse, P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. Cell, **79**:547, 1994.
Petronczki, M. *et al.* Un Ménage à Quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. Cell, **112**:423-440, 2003.
Prunuske, A.J. e Ullman, K. S. The nuclear envelope: form and reformation. Curr Opin Cell Biol, **18**:108, 2006.
Sasanuma H., Hirota K., Fukuda T. *et al.* Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. Genes & Development, **22**:398, 2008.
Schrank, I.S. e Silva, S.C. Replicação do DNA. In: Biologia Molecular Básica (Zaha A). Mercado Aberto, 1996.
Seki, A. *et al.*. Bora and the kinase Aurora A cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. Science **320**:1655, 2008.
Thornberry, N.A. e Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. Science, **281**:1312, 1998.
Zhang, K., Letham, D.S. e John, P.C.L. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. Planta, **200**:2, 1996.

Organelas Envolvidas na Síntese e na Degradação de Macromoléculas

Celia Guadalupe T. J. Andrade
Berenice Quinzani Jordão

Roteiro

- O estabelecimento de endomembranas é uma das principais aquisições evolutivas das células eucariontes
- Os polirribossomos citoplasmáticos sintetizam proteínas que se destinam ao citosol, às mitocôndrias, aos plastídios (plastos), aos peroxissomos e ao núcleo
- No retículo endoplasmático rugoso são sintetizadas proteínas destinadas ao retículo, à membrana plasmática, ao complexo de Golgi, aos lisossomos e à secreção celular
- A glicosilação das cadeias polipeptídicas inicia-se no interior das cisternas do retículo rugoso e termina no complexo de Golgi
- O retículo endoplasmático liso participa da síntese e da metabolização de lipídios na célula
- A síntese e a secreção de proteínas e lipídios envolvem cooperação entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi
- As cisternas do complexo de Golgi apresentam polaridade estrutural e de função
- No interior das cisternas golgianas ocorrem glicosilações, sulfatações e fosforilações de proteínas e lipídios
- A degradação de material capturado do meio extracelular ocorre pelas vias fagocítica e endocítica e de material intracelular segue a via autofágica
- Os lisossomos são ricos em enzimas digestivas que têm atividade em pH ácido
- Proteínas celulares são degradadas pelos proteossomos, complexos multienzimáticos do citoplasma e do núcleo de todas as células.

O processo de evolução das células eucariontes culminou com a aquisição de membranas internas que levaram, por sua vez, ao estabelecimento de compartimentos individualizados, com diferentes composições químicas e funções específicas: as organelas. Elas segregam e organizam os processos bioquímicos intracelulares, fornecendo a estrutura para o desenvolvimento e a diferenciação celular.

As organelas são constituídas por moléculas complexas que, com exceção do DNA, relativamente estável, estão em constante renovação. A célula captura nutrientes do meio extracelular, degrada-os e utiliza os produtos da degradação na síntese das moléculas necessárias às suas atividades. Para a manutenção da estrutura celular, é importante que existam mecanismos de síntese contínua de novas moléculas, bem como de degradação das macromoléculas em desuso ou que já cumpriram o seu papel.

Além dos ácidos nucleicos, estudados em outro capítulo, as principais macromoléculas encontradas nas células são as proteínas, os hidratos de carbono e os lipídios. Neste capítulo, serão abordados aspectos estruturais e funcionais das organelas celulares que participam da síntese, destinação e degradação dessas macromoléculas.

Retículo endoplasmático

Todas as células eucariontes contêm retículo endoplasmático (RE), que é constituído por uma rede de membranas que delimitam cavidades das mais diversas formas. Essas cavidades podem ser chamadas também de cisternas, lúmen ou luz. O RE se estende a partir do envoltório nuclear e percorre grande parte do citoplasma, formando uma rede tridimensional de cavidades que se intercomunicam. A microscopia eletrônica tornou possível identificar dois tipos morfologicamente diferentes de retículo: o retículo endoplasmático granular ou rugoso (REG ou RER), que apresenta ribossomos acoplados à face citoplasmática de suas membranas, e o retículo endoplasmático agranular ou liso (REA ou REL), que não contém ribossomos. Os ribossomos associam-se às membranas do retículo na forma de polirribossomos, ou seja, quando estão unidos por meio de uma molécula de mRNA e, portanto, encontram-se em plena atividade de síntese proteica. Essa associação sempre ocorre pela subunidade maior do ribossomo, enquanto a subunidade menor liga-se ao mRNA.

Ainda que os polirribossomos possam estar associados à membrana do retículo, também existem polirribossomos dispersos, livres no citoplasma (Figura 10.1). Estes são responsáveis pela síntese das proteínas que devem permanecer no citosol ou serem incorporadas no núcleo, mitocôndrias, cloroplastos ou peroxissomos. Exemplos de células que sintetizam proteínas a serem utilizadas no citosol são o eritroblasto (célula precursora dos glóbulos vermelhos do sangue), que sintetiza hemoglobina, e o cianoblasto, célula produtora de hemocianina, outro pigmento respiratório (Figura 10.2). Células que se reproduzem em ritmo acelerado, como células embrionárias ou de tumores de crescimento rápido, apresentam o citoplasma repleto de polirribossomos, que sintetizam proteínas para o crescimento do citoplasma e do núcleo das células-filhas, após cada ciclo mitótico.

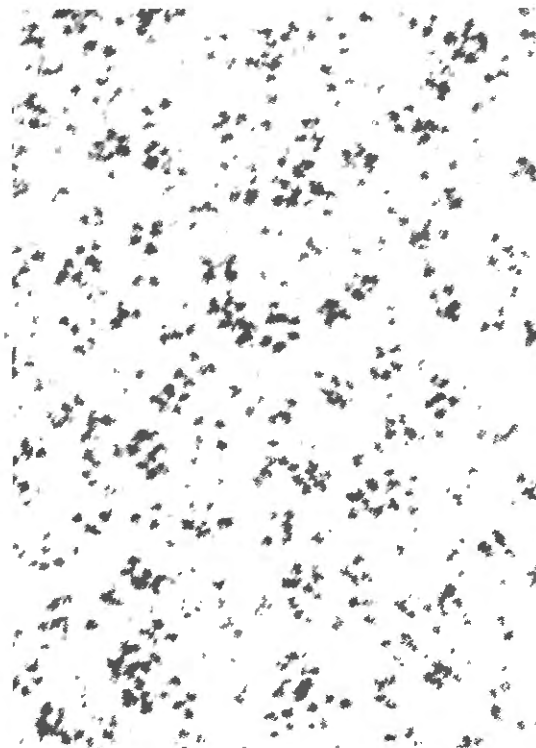



Figura 10.1 ▪ Esta eletromicrografia de célula que sintetiza proteína mostra os polirribossomos, que são grupos de ribossomos ligados a uma molécula de RNA mensageiro. O RNA mensageiro que une os ribossomos não é visível nesse preparado. 100.000×.

Por outro lado, as proteínas sintetizadas nos polirribossomos aderidos às membranas do retículo endoplasmático são aquelas destinadas a permanecer no próprio retículo, ser transportadas para o complexo de Golgi, formar lisossomos, compor membrana plasmática ou serem secretadas da célula. As células acinosas do pâncreas, que produzem enzimas digestivas, bem como as células caliciformes do intestino são exemplos de células que sintetizam proteínas para secreção.

As diferenças quanto ao local e ao tipo de síntese de proteínas possibilitam classificar as células em quatro tipos gerais, ilustrados na Figura 10.3 e descritos a seguir:

- Células que sintetizam ativamente proteínas que permanecem no citosol e não são segregadas nas cisternas do RER: nessas células, as proteínas são sintetizadas em polirribossomos livres no citosol, não presos ao retículo, que ocupam grande parte do citoplasma (Figura 10.3A). São exemplos desses tipos celulares os eritroblastos, as células embrionárias e as de tumores de crescimento rápido
- Células que sintetizam e segregam proteínas nas cisternas do RER e exportam essas proteínas diretamente, sem acumulá-las em grânulos: nessas células, a síntese proteica é realizada por polirribossomos aderidos à face citoplasmática da membrana do RER. Elas apresentam complexo de Golgi desenvolvido, e, nelas, não há grânulos de secreção. São exemplos desse tipo celular os fibroblastos, que secretam matriz extracelular, e os plasmócitos, que secretam anticorpos (Figura 10.3B)
- Células que sintetizam proteínas que são segregadas nas cisternas do RER passam para o complexo de Golgi e, depois, são acumuladas em grânulos, que geralmente permanecem

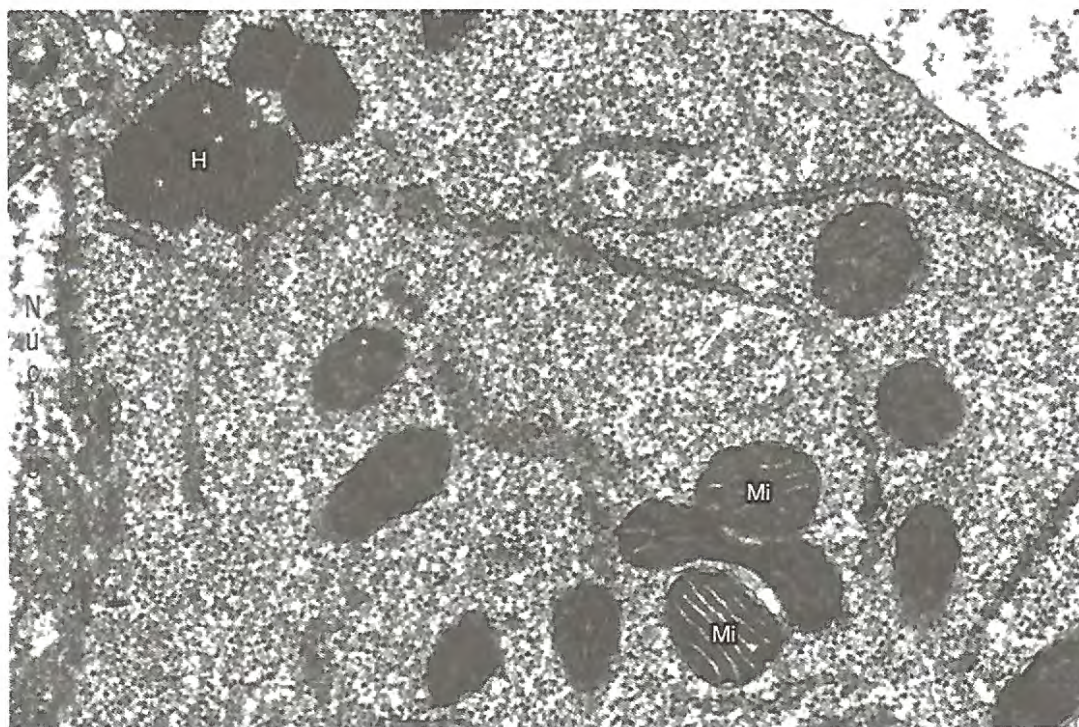



Figura 10.2 ▪ Eletromicrografia de cianoblasto de *Limulus*. Essa célula produz um pigmento respiratório azul, a hemocianina. *Na extremidade esquerda* da foto, aparece pequena parte do núcleo celular. *Em cima*, também *à esquerda*, cristaloide do pigmento respiratório hemocianina (H). O citoplasma se apresenta cheio de polirribossomos, uma característica de célula que produz proteína para o citosol. As setas apontam vesículas achatadas do retículo endoplasmático rugoso, raras nessas células. *À direita, embaixo*, mitocôndrias (Mi). 44.000×. (Cortesia de Fahrenbach, W.H. *J. Cell Biol.*, **44**:445, 1970. Reprodução autorizada.)

nas células para uso posterior: é o caso dos leucócitos eosinófilos, neutrófilos e monócitos, assim como dos macrófagos, que apresentam no citoplasma grânulos que contêm proteínas e enzimas com diversas funções (Figura 10.3C).

- Células que sintetizam, segregam e acumulam proteínas em grânulos de secreção, que serão exportados por exocitose: são exemplos as células secretoras exócrinas do pâncreas e da glândula salivar parótida, que produzem enzimas digestivas empacotadas em vesículas ou grânulos envoltos por membrana que, sob o estímulo apropriado, serão secretadas para digerir os alimentos (Figura 10.3D).

Além dos polirribossomos, outros aspectos também diferenciam o RER do REL. O RER, na maioria das células, é constituído por lâminas achatadas dispostas paralelamente (Figura 10.4). Suas cavidades podem apresentar-se mais ou menos dilatadas, de acordo com o estado funcional da célula. O REL, por sua vez, mostra-se geralmente na forma de vesículas globulares ou como túbulos contorcidos (Figura 10.5), que podem ter continuidade com o RER. Os dois tipos de retículo não apresentam somente diferenças morfológicas, mas também de composição química e de função, aspectos que serão discutidos mais adiante, neste capítulo.

O retículo endoplasmático é visível apenas ao microscópio eletrônico, pois a espessura de suas membranas está abaixo do poder de resolução do microscópio óptico (microscópio de luz). Sua presença pode, no entanto, ser evidenciada ao microscópio de luz, desde que as células sejam coradas com corantes básicos. Essas porções coradas foram, inicialmente, denominadas de regiões basófilas do citoplasma e, posteriormente, de ergastoplasma (do grego *ergazomai*, elaborar). Em

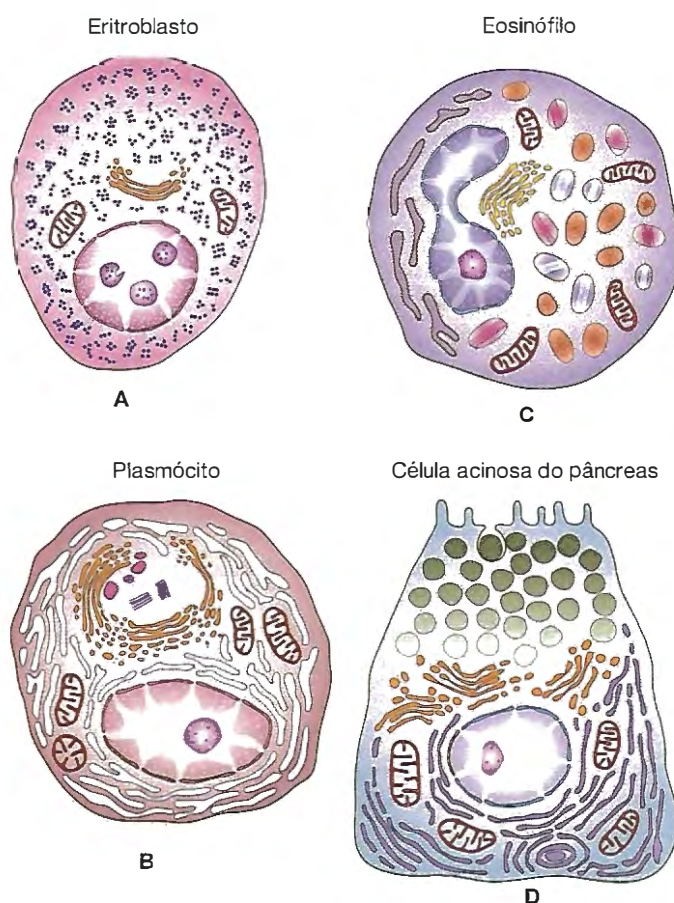



Figura 10.3 ▪ Esquema que mostra a ultraestrutura característica dos quatro tipos gerais de células com intensa atividade de síntese proteica. A ultraestrutura varia de acordo com o destino das proteínas sintetizadas. (Explicação no texto.)

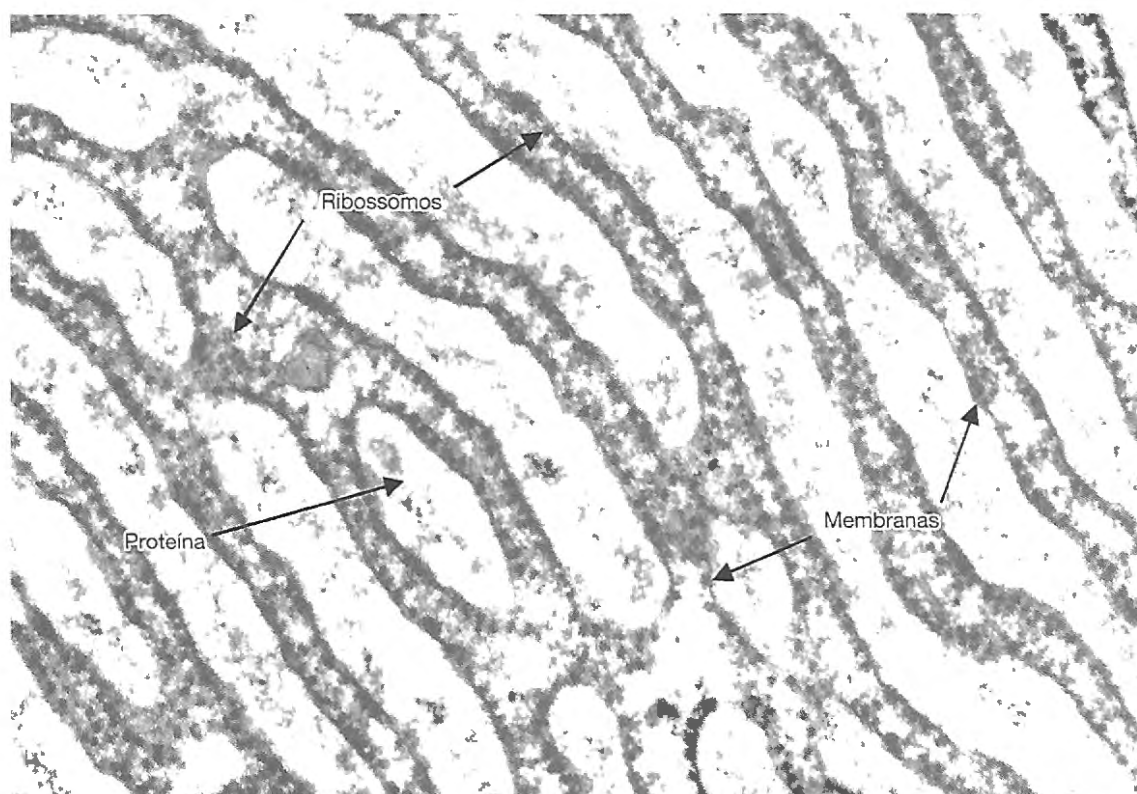



Figura 10.4 ▪ Esta eletromicrografia de célula que sintetiza muita proteína mostra uma região rica em retículo endoplasmático rugoso (RER ou REG). As membranas do RER apresentam ribossomos ligados à sua superfície externa (citosólica). As moléculas proteicas sintetizadas são segregadas no interior das cisternas do retículo, nas quais aparecem como um material granular. 84.000×.

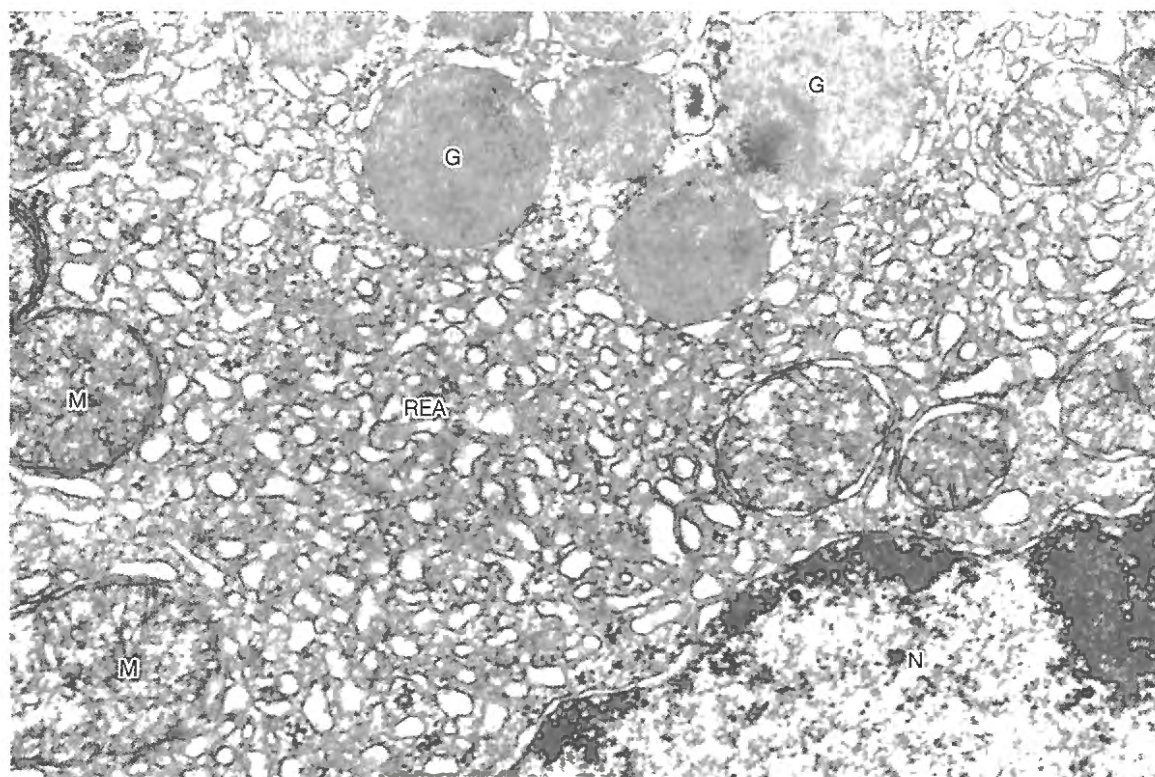



Figura 10.5 ▪ Eletromicrografia de corte de célula intersticial do testículo que mostra o retículo endoplasmático liso (REL ou REA) formado por túbulos que se anastomosam. **N** = núcleo; **M** = mitocôndria; **G** = gotículas lipídicas. 40.000×.

neurônios, essas porções basófilas foram denominadas corpúsculos de Nissl. Com o advento da microscopia eletrônica, constatou-se que todas essas regiões correspondiam ao retículo endoplasmático rugoso.

O tipo de retículo e a sua quantidade na célula variam entre os diferentes tipos celulares e de acordo com a atividade de síntese da célula. O retículo rugoso participa da síntese de proteínas, enquanto o liso está envolvido no metabolismo de lipídios. Assim, células que sintetizam e secretam proteínas ativamente apresentam retículo rugoso bem desenvolvido, chegando a ocupar, nos cortes, uma área de citoplasma que representa mais da metade da área total da célula. Por outro lado, em células envolvidas no metabolismo de lipídios, como as células intersticiais do testículo e da glândula adrenal, há grande quantidade de retículo liso. Os hormônios secretados por essas células são de natureza lipídica. Além disso, a posição ocupada pelo retículo no citoplasma varia de um tipo celular para outro.

Na maioria das células, o retículo endoplasmático se localiza próximo ao núcleo. Células que secretam proteínas geralmente são polarizadas, ou seja, apresentam diferentes domínios estruturais e funcionais no citoplasma. Um exemplo é a célula acinosa do pâncreas, que apresenta retículo endoplasmático rugoso apenas na porção basal, em torno do núcleo, enquanto a porção apical é ocupada pelas vesículas de secreção. Por outro lado, células que sintetizam muitas proteínas, mas não as acumulam – como os plasmócitos, que secretam continuamente – contêm RER disperso pelo citoplasma, sem localização preferencial. Células que mantêm um nível basal de síntese proteica, como os linfócitos circulantes no sangue e na linfa, contêm poucas cisternas do RER, que também são dispersas.

Composição química

A composição química dos componentes do retículo endoplasmático pode ser determinada *in situ*, por meio de métodos citoquímicos e/ou imunocitoquímicos ou em frações isoladas da célula.

Estudo *in situ*

Os métodos citoquímicos possibilitam detectar a atividade de uma determinada enzima que é específica da organela em estudo. No caso do retículo endoplasmático liso, a enzima glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) é considerada marcadora dessa organela, por essa especificidade. Essa enzima participa da obtenção de glicose a partir do glicogênio, na glicogenólise. Para detectar a atividade da glicose-6-fosfatase, fragmentos do tecido em estudo são fixados em glutaraldeído e, em seguida, incubados em um meio contendo o substrato da enzima – no caso, a glicose-6-fosfato – mais nitrato de chumbo. A glicose-6-fosfatase encontrada nas células do tecido retirará o fosfato da glicose-6-fosfato. Este, por sua vez, se complexará com o chumbo, formando fosfato de chumbo, um precipitado elétron-denso observado nas porções do retículo onde está situada a enzima. O precipitado elétron-denso pode tornar-se visível ao microscópio de luz se o material for tratado, em seguida, com sulfeto de amônia, quando então se forma um precipitado negro de sulfeto de chumbo.

A utilização de métodos imunocitoquímicos (descritos no Capítulo 2) possibilita, também, detectar a presença de determinada proteína em uma organela. Essa proteína deve ser específica da organela em estudo, de modo a tornar possível que ela seja reconhecida por anticorpos. O reconhecimento entre a proteína e seu anticorpo é detectado por um composto colorido, fluorescente ou elétron-denso, que esteja ligado ao anticorpo. Proteínas tais como as chaperonas moleculares (discutidas mais adiante neste capítulo) são consideradas específicas do RER e podem ter sua presença detectada por imunocitoquímica.

Estudo de frações isoladas

Frações do retículo podem ser obtidas submetendo-se homogenados do tecido em estudo à centrifugação fracionada (consulte o Capítulo 2 para detalhes do método), em que a terceira fração que se sedimenta é constituída por vesículas lisas e rugosas, resultantes da fragmentação dos dois tipos de retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Utilizando-se solução hipotônica e nova centrifugação, são obtidas as subfrações membrana e o conteúdo das cavidades, que podem ter sua composição química determinada por métodos bioquímicos.

Membranas do RE são lipoproteicas e assimétricas

Como todas as demais membranas biológicas, as membranas do retículo são lipoproteicas, contendo 30% de lipídios e 70% de proteínas. Essas membranas são mais finas que a membrana plasmática, tendo cerca de 6 nm de espessura, o que se deve ao menor comprimento das cadeias de ácidos graxos dos lipídios presentes. Os lipídios mais abundantes são os fosfolipídios, representados pela fosfatidilcolina (cerca de 60% do total de fosfolipídios), seguida por fosfatidiletanolamina (25%), fosfatidilinositol (10%), fosfatidilserina (4%) e esfingomielina (4%). Contêm, ainda, pequena quantidade de glicolipídios e colesterol.

Dentre as proteínas, foram identificadas cerca de 30 cadeias polipeptídicas, inclusive algumas glicoproteínas e numerosas enzimas. As enzimas são representadas pelas hidrolases, como a glicose-6-fosfatase, por aquelas que participam da síntese de fosfolipídios e de esteroides, bem como pelas glicosiltransferases, enzimas que catalisam a adição de oligossacarídios a proteínas e lipídios. Nessas membranas há, também, duas cadeias transportadoras de elétrons, cada uma com um citocromo específico: o citocromo P450 e o citocromo b_5 e suas respectivas redutases. O RE é ancorado ao citoesqueleto pela CLIMP-63 (peso molecular = 63 kDa), uma proteína transmembrana, cuja face citosólica liga-se aos microtúbulos, enquanto a face luminal forma um esqueleto proteico no lúmen do retículo, contribuindo para a manutenção da morfologia das suas cisternas (Figura 10.6). A maioria dessas proteínas é comum aos dois tipos de RE. As membranas do RER, no entanto, são ricas em algumas proteínas específicas, tais como aquelas envolvidas na associação dos

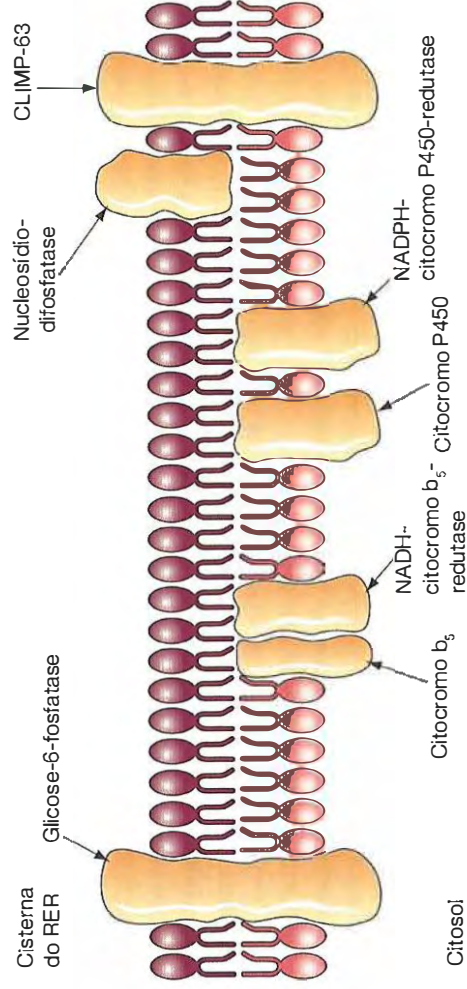



Figura 10.6 ▪ Esquema que ilustra a disposição de algumas proteínas e complexos citocromo-redutases na bicamada lipídica do retículo endoplasmático.

ribossomos e na translocação e interiorização das cadeias polipeptídicas.

Como a maioria das membranas biológicas, as membranas do retículo também são assimétricas, isto é, tanto as proteínas quanto os lipídios estão diferentemente distribuídos entre a monocamada citosólica e a luminal. Fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina localizam-se, preferencialmente, na face citosólica, enquanto esfingomielina e fosfatidilinositol estão voltados para a face luminal. A glicose-6-fosfatase é uma proteína intrínseca à membrana, com nove domínios helicoidais transmembranosos e o sítio ativo voltado para a face luminal da cisterna, enquanto o citocromo b_5, o citocromo P450 e suas respectivas redutases estão voltados para a face citosólica. A CLIMP-63, por sua vez, é uma proteína transmembrana que provoca saliência em ambas as faces da membrana (Figura 10.6). Essa distribuição está diretamente relacionada com a função que essas proteínas desempenham no RE. Além disso, as porções glicídicas dos lipídios e proteínas estão voltadas para o interior da cisterna, ao contrário do que ocorre na superfície celular.

▪ Conteúdo das cisternas

O conteúdo das cisternas varia de acordo com o tipo de retículo, o tipo celular e o estado fisiológico da célula. Geralmente, elas contêm uma solução aquosa, em que estão mergulhadas proteínas, glicoproteínas e lipoproteínas. Nos plasmócitos, por exemplo, as cavidades contêm imunoglobulinas; em fibroblastos, são encontradas cadeias de protocolágeno, enquanto nas células exócrinas do pâncreas são encontradas hidrolases ácidas. Nas células da glândula adrenal, por outro lado, as cavidades do REL contêm hormônios esteroides.

▪ *Algumas funções são comuns aos dois tipos de retículo*

Os retículos endoplasmáticos liso e rugoso desempenham algumas funções em comum na célula, como a segregação dos produtos sintetizados em suas membranas no interior de suas cavidades. Além disso, a grande área de citoplasma ocupada pelo sistema de endomembranas do retículo fornece suporte mecânico ao citosol, juntamente com os microtúbulos e microfilamentos.

Existem, no entanto, algumas funções específicas de cada um dos tipos de retículo, as quais serão abordadas separadamente. Em resumo, o RER está envolvido na síntese, na segregação e no processamento de proteínas constituintes de membranas e proteínas de secreção. O REL, por sua vez, participa da síntese de lipídios, de processos de desintoxicação, da degradação de glicogênio e da regulação do Ca^{2+} intracelular. Na célula muscular estriada, o REL recebe o nome de retículo sarcoplasmático e é responsável pelo controle na concentração do Ca^{2+} envolvido na contração muscular.

▪ O RER sintetiza e segrega as cadeias polipeptídicas

As cadeias polipeptídicas sintetizadas nos polirribossomos acoplados às membranas do RER são transferidas para o interior das cisternas enquanto ainda estão sendo traduzidas. Elas são processadas e acumuladas nas cisternas, de onde são transportadas, no interior de vesículas, para seus locais de destino. Essas proteínas irão compor tanto as membranas quanto o interior das cavidades do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi e dos lisossomos. Também irão constituir a membrana plasmática e a secreção celular.

De modo geral, a estrutura primária das proteínas é determinada pela sequência de nucleotídios do mRNA que irá codificá-la. Cada três nucleotídios dessa sequência codifica um aminoácido específico e constitui um códon. No início da síntese proteica, a subunidade menor de um ribossomo se associa ao primeiro códon, localizado na extremidade 5′ do mRNA. A esse códon então exposto se associa o aminoácido específico, que foi reconhecido e transportado a esse local por um tRNA apropriado. Então, a subunidade maior do ribossomo se associa à menor. O ribossomo se desloca ao longo da molécula de mRNA, em direção à sua extremidade 3′, traduzindo cada códon no seu respectivo aminoácido, e assim formando a cadeia polipeptídica. À medida que o ribossomo se transfere de um códon para o seguinte, outros ribossomos

se associam ao mRNA, constituindo um polirribossomo. O número de ribossomos que se associa a uma única molécula de mRNA depende do peso molecular desse mRNA. Quanto maior a proteína codificada por aquele mRNA, maior será a molécula de mRNA e, consequentemente, maior o número de ribossomos que se associará a ele. Cada ribossomo sintetiza uma única cadeia polipeptídica; portanto, o número de moléculas sintetizadas simultaneamente depende também do peso molecular do mRNA.

As proteínas que devem ser sintetizadas nos polirribossomos ligados ao RER são marcadas com uma sequência de cerca de 20 aminoácidos, chamada sequência sinal. A sequência sinal é o primeiro segmento da cadeia polipeptídica a ser traduzido, e sua sequência de aminoácidos varia bastante entre as espécies, mas todas elas se caracterizam pela presença, nesta sequência, de oito ou mais aminoácidos apolares. Se, por engenharia genética, uma sequência sinal é adicionada a proteínas que são sintetizadas por polirribossomos citosólicos, estes passam a se ligar às membranas do retículo, e a proteína é, então, segregada e pode ser secretada. À medida que a sequência sinal emerge do ribossomo, ela é reconhecida por uma partícula citoplasmática, chamada de partícula de reconhecimento de sinal ou PRS, formada por uma cadeia de RNA 7S complexada com seis cadeias polipeptídicas (Figura 10.7). A associação da PRS à sequência sinal interrompe a síntese proteica, que será reiniciada somente quando a PRS encontrar seu receptor, uma proteína intrínseca encontrada na superfície citosólica da membrana do retículo rugoso. A PRS liga-se a seu receptor apenas quando uma molécula de GTP liga-se a ambos. Quando a PRS interage com o receptor, desliga-se do complexo ribossomo-cadeia polipeptídica, e a subunidade maior do ribossomo liga-se a um complexo proteico intrínseco à membrana do RER, prosseguindo a tradução. A hidrólise do GTP (formando GDP) faz com que a PRS dissocie-se do seu receptor. A cadeia polipeptídica é transferida através da membrana pelos translocons, que são canais aquosos que podem alcançar de 2 a 6 nm de diâmetro (Figura 10.7). O componente central do translocon é o complexo Sec 61, constituído por três proteínas transmembrana, denominadas α (alfa), β (beta) e γ (gama). Associadas ao complexo Sec 61 e envolvidas também na translocação da cadeia polipeptídica, estão as proteínas TRAM (do inglês *translocating chain-associated membrane*), o complexo proteico TRAP (do inglês, *translocon-associated protein)*, a peptidase sinal (ver adiante) e o complexo OST (ver adiante). As proteínas do complexo Sec 61 reconhecem a subunidade maior do ribossomo, ligam-se a ela e funcionam como um túnel para a passagem da cadeia polipeptídica. A sequência sinal se liga a um local específico do complexo Sec 61, causando uma alteração conformacional que abre o canal aquoso, tornando possível que a cadeia polipeptídica

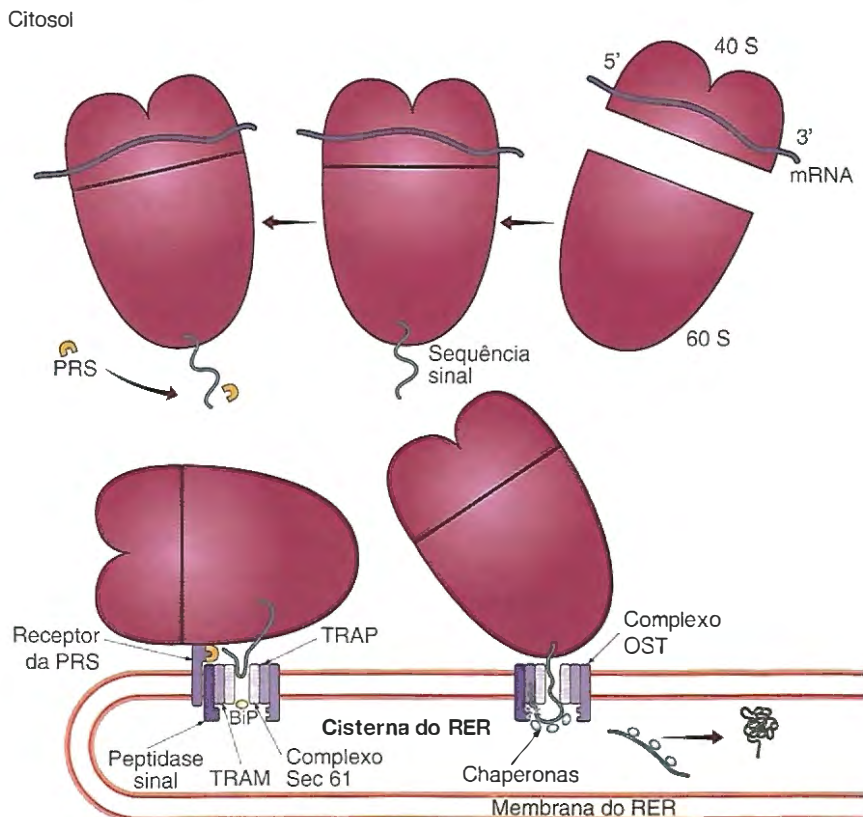



Figura 10.7 ▪ Desenho que mostra a sequência dos principais eventos que ocorrem durante a síntese proteica no RER. A síntese inicia-se no citosol, e a primeira porção da cadeia a ser sintetizada é a sequência sinal, que destina o polirribossomo para a membrana do RER. A síntese é interrompida quando a partícula reconhecedora do sinal (PRS) liga-se à sequência sinal. A síntese recomeça quando o ribossomo e a proteína reconhecedora do sinal se ligam a seus respectivos receptores na membrana do RER. Quando a tradução recomeça, a PRS se desliga e volta para o citosol. O ribossomo se associa ao translocon, que é um agregado proteico constituído pelo complexo Sec 61, a proteína associada à translocação (TRAM), a peptidase sinal, o complexo oligossacariltransferase (OST) e a proteína associada ao translocon (TRAP). A BiP associa-se como uma rolha na superfície luminal do translocon e só se dissocia quando o complexo Sec 61 se abre como um túnel para a passagem da cadeia através da membrana. À medida que a cadeia é translocada, a sequência sinal é clivada pela peptidase sinal, as chaperonas moleculares se associam à cadeia e o complexo OST adiciona oligossacarídios à cadeia polipeptídica (não mostrada). Quando a cadeia é liberada no interior da cisterna, as chaperonas fazem com que ela adquira a sua configuração tridimensional. Uma vez terminada a síntese do polipeptídio, as duas subunidades do ribossomo se separam e podem ser reutilizadas.

nascente passe através desse túnel. Além disso, a proteína BiP (do inglês, *binding protein*) associa-se ao complexo Sec 61, funcionando como uma rolha no lado luminal do translocon. Quando o canal aquoso se abre, a BiP se dissocia, possibilitando a passagem da cadeia polipeptídica. A primeira porção da cadeia polipeptídica a atravessar o túnel formado pelo complexo Sec 61 é a sequência sinal. À medida que a sequência sinal atravessa o túnel e a cadeia polipeptídica penetra nas cisternas do retículo, a enzima associada ao complexo Sec 61, peptidase sinal, cliva a sequência sinal, e o restante da cadeia polipeptídica é liberado no interior da cisterna (Figura 10.7). O complexo proteico OST (do inglês, *oligosacaril transferase complex*), associado ao translocon, adiciona oligossacarídios às cadeias polipeptídicas à medida que elas são translocadas, como veremos mais adiante.

Por outro lado, se a proteína for destinada a compor membranas, ou seja, se for uma proteína intrínseca da membrana do RE, do complexo de Golgi ou dos lisossomos, ela não é liberada no interior da cisterna. Ao contrário, parte da proteína permanece inserida na membrana do retículo, à medida que ocorre sua translocação para o interior da cisterna (Figura 10.8). Isso ocorre porque, quando a cadeia polipeptídica está sendo translocada através da membrana do retículo, a sequência sinal é clivada e a cadeia polipeptídica é então ancorada na membrana por meio de um segundo segmento com conformação secundária em α-hélice, hidrofóbico, situado na parte mais interna da cadeia. Esse segmento constitui-se em uma sequência de parada da transferência e bloqueia a translocação do restante da cadeia polipeptídica. Em seguida, o complexo Sec 61 abre-se lateralmente, liberando a proteína, que se difunde pela bicamada lipídica (Figura 10.8). Depois de inserida, ela é transportada como parte integrante da membrana de vesículas que brotam do retículo e que se dirigem para as membranas-alvo. Assim, a proteína é transportada para seu destino final como constituinte de membranas, e não como proteína solúvel. Essas proteínas intrínsecas podem atravessar a membrana uma ou mais vezes. Sugere-se que as proteínas que atravessam várias vezes a membrana o façam por apresentarem sequências sinal situadas no meio da cadeia polipeptídica que se alternam com sequências de parada da transferência da cadeia. Além disso, algumas proteínas são orientadas com sua extremidade aminoterminal voltada para o citosol, enquanto outras expõem sua extremidade carboxiterminal para o lado citosólico da membrana. Essas orientações de proteínas que irão compor as membranas do RE, do Golgi, dos lisossomos ou a membrana plasmática são estabelecidas à medida que as cadeias polipeptídicas são translocadas através da membrana do RE. O lúmen do RE é topologicamente equivalente ao exterior da célula; assim, as regiões das cadeias polipeptídicas que são translocadas para o interior do retículo correspondem aos domínios das proteínas da membrana plasmática que estão expostos na superfície celular (Capítulo 5).

As proteínas que serão secretadas e, portanto, liberadas no lúmen do RE, depois de terem sua sequência sinal clivada pela peptidase sinal, penetram no RE em configuração primária. A cadeia polipeptídica que penetra nas cisternas do retículo pode ainda não ser funcional, necessitando de processamentos adicionais. Esses processamentos envolvem modificações pós-traducionais, como dobramentos da cadeia para que esta assuma sua conformação tridimensional secundária ou terciária, ou, ainda, a reunião de várias cadeias polipeptídicas para formar proteínas multiméricas (conformação proteica quaternária). Os dobramentos da cadeia polipeptídica são determinados pela sua sequência de aminoácidos, mas são facilitados por outras proteínas, chamadas chaperonas moleculares. As chaperonas ligam-se transitoriamente à cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada, não participando da estrutura final da proteína (Figura 10.7). Elas garantem o dobramento correto da cadeia polipeptídica, impedem a agregação e asseguram que pontes dissulfeto sejam estabelecidas entre os aminoácidos sulfatados. Vários tipos de chaperonas foram caracterizados, tais como a calnexina, a calreticulina, a dissulfeto-isomerase e a BiP (já mencionada). A calnexina é uma proteína intrínseca à membrana do retículo, enquanto a calreticulina, a BiP e a dissulfeto-isomerase são proteínas solúveis, localizadas no interior das cisternas. Todas essas chaperonas partilham a mesma função, ou seja, elas se ligam à cadeia polipeptídica à medida que esta é translocada através da membrana e, então, catalisam o dobramento da molécula e a reunião das subunidades proteicas. Tanto a calnexina quanto a calreticulina têm atividade dependente de íons Ca^{2+} e estão envolvidas no processamento das glicoproteínas, enquanto a BiP, que tem atividade ATPásica, apresenta função primordial no dobramento das proteínas não glicosiladas. A dissulfeto-isomerase, por sua vez, catalisa o estabelecimento das pontes dissulfeto

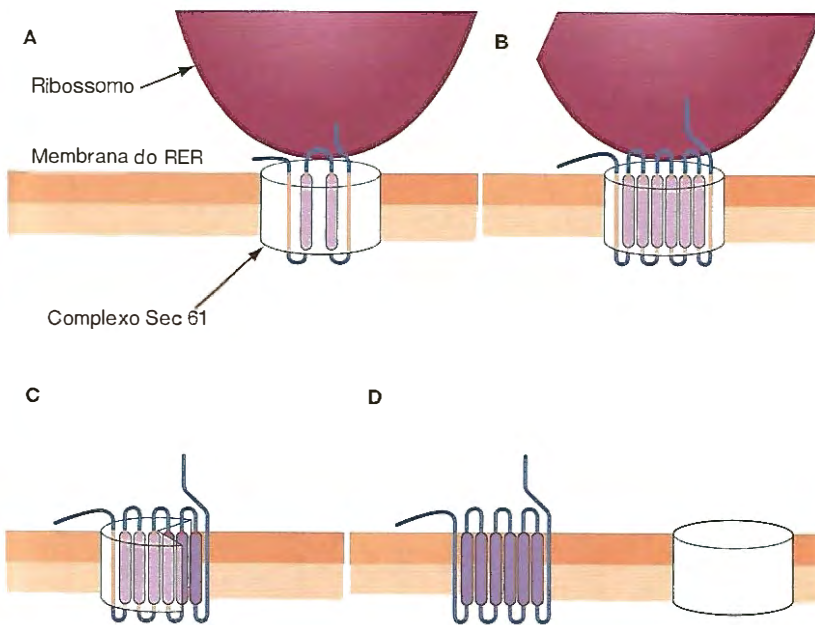



Figura 10.8 ▪ Esquema que ilustra a inserção de uma proteína intrínseca na membrana do RER. Em **A** e **B**, a cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada apresenta segmentos em α-hélice que contêm aminoácidos hidrofóbicos, que constituem as sequências de parada de transferência e são inseridos no complexo Sec 61. **C.** Ao término da síntese, o complexo Sec 61 abre-se lateralmente e libera a cadeia polipeptídica. **D.** A cadeia se difunde na bicamada lipídica.

entre resíduos de cisteína das proteínas (Cis-S-S-Cis), que são muito importantes para a estabilização destas proteínas em sua configuração tridimensional.

As chaperonas são responsáveis, ainda, pelo "controle de qualidade" das proteínas sintetizadas no retículo. Aquelas proteínas que são dobradas ou reunidas incorretamente retornam ao citosol, passando pelo complexo Sec 61, em um processo de translocação em sentido inverso, ou seja, de retrotranslocação ou deslocação. No citosol, elas são degradadas por complexos multienzimáticos, como veremos mais adiante.

Até há pouco tempo, as chaperonas eram conhecidas como proteínas de choque térmico, abreviadas como Hsp (do inglês, *heat-shock proteins*), uma família de proteínas que se expressavam em células submetidas a temperaturas elevadas ou a algum tipo de estresse ambiental. Muitas dessas proteínas foram, no entanto, detectadas em células que crescem em condições normais, nas quais têm função de chaperonas. As chaperonas também se ligam às cadeias polipeptídicas que são sintetizadas nos polirribossomos livres no citosol, mantendo a conformação estendida dessas cadeias até que a síntese seja completada.

Enquanto a cadeia polipeptídica é transcrita e translocada para as cisternas do retículo, inicia-se a sua glicosilação, que é feita pela transferência de um oligossacarídio contendo 14 resíduos de açúcar, dos quais dois resíduos são de N-acetilglicosamina, três de glicose e nove de manose (Figura 10.9). Cada oligossacarídio transferido é ligado ao grupo amino (NH_2) dos aminoácidos asparagina encontrados na cadeia polipeptídica em formação, razão pela qual é do tipo dos chamados oligossacarídios N-ligados. Esse oligossacarídio é proveniente do próprio retículo, em que é polimerizado e mantém-se ligado a um lipídio encontrado na membrana, o dolicol fosfato, do qual é transferido, como um bloco, à cadeia polipeptídica pelas proteínas do complexo OST ou oligossacaril-transferase, que é intrínseco à membrana do RER (Figura 10.9). A energia para a ligação é fornecida pela quebra de uma ligação de fosfato que mantém o oligossacarídio ligado ao dolicol. Ainda no interior das cisternas do retículo, dois resíduos de glicose e um de manose são removidos da cadeia, pelas enzimas glicosidases I e II e manosidase, respectivamente. Quando o primeiro resíduo de glicose é retirado, as chaperonas calnexina ou calreticulina ligam-se à cadeia polipeptídica e atuam no seu dobramento. A retirada da segunda glicose causa a dissociação das chaperonas e a liberação da cadeia polipeptídica. Se a glicoproteína recém-formada está dobrada incorretamente, ela é reglicosilada e novamente reconhecida pelas chaperonas. Outras moléculas de açúcar podem ser adicionadas posteriormente no complexo de Golgi, como será discutido mais adiante.

As proteínas sintetizadas e processadas no retículo endoplasmático são exportadas em vesículas de transporte que brotam das membranas do retículo e se fundem com as membranas do complexo de Golgi. As vesículas brotam de uma região especializada do RER que não apresenta polirribossomos acoplados às membranas, denominada elemento transicional ou retículo endoplasmático transicional.

As vesículas de transporte que brotam do elemento transicional se fundem para formar uma rede de estruturas tubulares, que constitui o compartimento intermediário RE-Golgi. Neste compartimento ocorre a seleção das moléculas, ou seja, proteínas específicas do RE que foram liberadas erroneamente no interior das vesículas são recuperadas de volta em vesículas que brotam deste compartimento. Esse transporte se faz pela associação das vesículas com microtúbulos citosólicos. Por outro lado, proteínas destinadas aos compartimentos subsequentes são enviadas para as cisternas do *cis*-Golgi.

Proteínas que se situam no RE recebem marcação específica

Ao mesmo tempo em que o RER exporta proteínas para o complexo de Golgi, deve também manter sua própria composição química, determinante tanto da sua estrutura quanto da sua função. A manutenção de proteínas no retículo depende da concentração de Ca^{2+} no interior das cisternas e também de sequências de aminoácidos presentes na molécula, que atuam

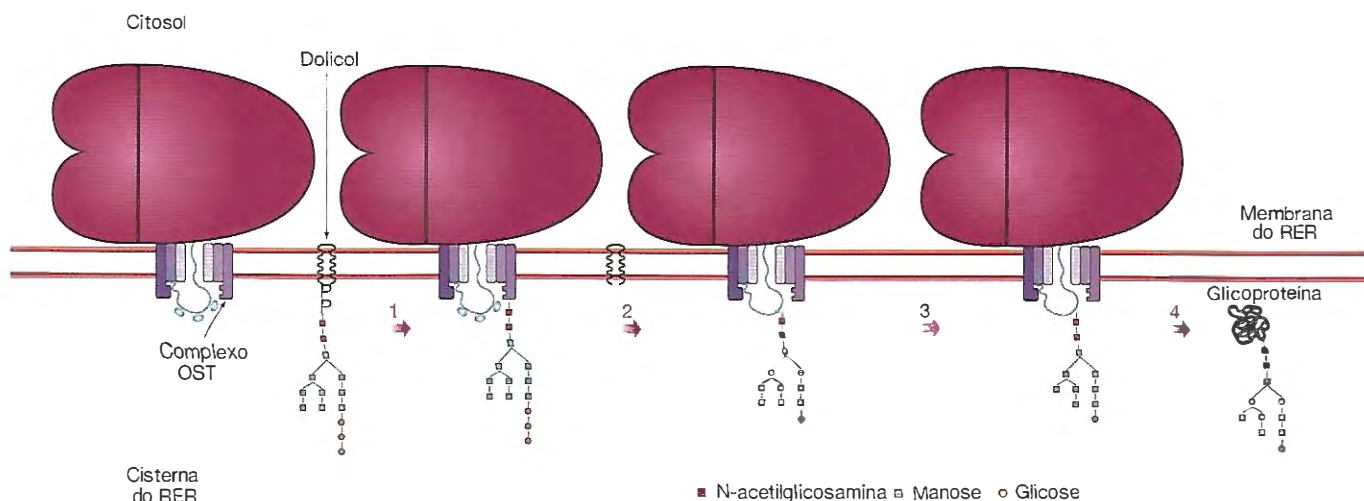



Figura 10.9 ▪ Esquema da glicosilação da cadeia polipeptídica no interior da cisterna do RER. O bloco de oligossacarídios, formado por 14 resíduos de açúcares, liga-se à membrana por meio do dolicol fosfato. À medida que a cadeia é translocada, o bloco de oligossacarídios é transferido para o complexo OST (1) e deste para a cadeia polipeptídica (2). Ainda na cisterna do RER, dois resíduos de glicose (2) e um de manose (3) são extirpados do bloco de oligossacarídios. A cadeia polipeptídica glicosilada é, então, liberada na cisterna e assume sua estrutura tridimensional graças ao auxílio das chaperonas (4).

como sinais de destinação. Esses sinais agem por dois mecanismos complementares: retenção na organela e recuperação, ou seja, atuam mantendo a proteína na organela e são necessários, também, para recuperar (reaver) proteínas que são residentes, mas que, erroneamente, saíram da organela. As proteínas solúveis do RE contêm uma sequência marcadora composta pelos aminoácidos lisina ou histidina, asparagina, ácido glutâmico e leucina (Lys/His-Asp-Glu-Leu), conhecida como KDEL ou HDEL, uma vez que a cada aminoácido se atribui uma dada letra. Se a proteína for erroneamente transportada para o complexo de Golgi no interior das vesículas, assim que chega a essa organela ela é transportada de volta para o retículo. A sequência H/KDEL é reconhecida por um receptor específico presente nas membranas do complexo de Golgi, o que faz com que essas proteínas retornem ao RE em vesículas contendo esse receptor em suas membranas. As proteínas transmembranosas, por outro lado, são selecionadas para retenção no RE por dois tipos diferentes de marcação. Um deles é uma sequência KKXX ou KXKXX, em que K é o aminoácido lisina e X pode ser qualquer aminoácido. Outras são marcadas por um domínio na proteína que apresenta dois resíduos do aminoácido arginina localizados lado a lado ou separados por outro aminoácido.

O REL participa da síntese de lipídios da célula

Nas membranas do retículo endoplasmático liso ocorre a síntese de praticamente todos os lipídios que compõem as membranas celulares, incluindo os fosfolipídios e o colesterol. Alguns dos lipídios das membranas são inicialmente produzidos no REL e suas moléculas são completadas no complexo de Golgi. Isso acontece com a esfingomielina e com os glicolipídios, cujas porções glicídicas são produzidas com a colaboração do complexo de Golgi. Outros, ainda, envolvem a participação de enzimas encontradas nas mitocôndrias, como veremos adiante.

As enzimas que sintetizam fosfolipídios são intrínsecas à membrana do retículo liso, com seus sítios ativos formando saliência na face citoplasmática da membrana (Figura 10.6). Como descrito no Capítulo 5, os principais lipídios das membranas das células eucariontes são os fosfolipídios, os glicolipídios e o colesterol. A maioria dos fosfolipídios são sintetizados na face citosólica da membrana do retículo, a partir de uma molécula de glicerol e de duas moléculas de ácidos graxos ligadas à coenzima A (CoA) (Figura 10.10). Inicialmente, duas moléculas de ácidos graxos são transferidas da CoA para o glicerol 3-fosfato por acil-transferases, resultando no ácido fosfatídico, que é então inserido na membrana. Enzimas que catalisam a adição de diferentes grupamentos polares ao ácido fosfatídico levam à formação de fosfatidilcolina e fosfatidilserina. A fosfatidilserina, por sua vez, é convertida a fosfatidiletanolamina pela enzima fosfatidilserina-descarboxilase, uma enzima encontrada na membrana mitocondrial interna. Assim, a fosfatidilserina sintetizada nas membranas do REL deve ser transferida para a mitocôndria para ser descarboxilada e convertida a fosfatidiletanolamina, que é transportada de volta para o REL, no qual sofre metilação (adição de um grupo metil). A síntese do fosfatidilinositol é mais complexa e envolve a participação de enzimas encontradas tanto nas membranas do REL quanto das mitocôndrias.

Como as enzimas do REL envolvidas na síntese estão localizadas apenas na hemicamada citoplasmática das membranas, as novas moléculas de fosfolipídios são inseridas nesse folheto da membrana. Posteriormente, algumas moléculas são transferidas para a monocamada interna, voltada para o interior da cisterna, com o auxílio de proteínas denominadas flipases (do inglês *flip*, movimento rápido). Na membrana plasmática,

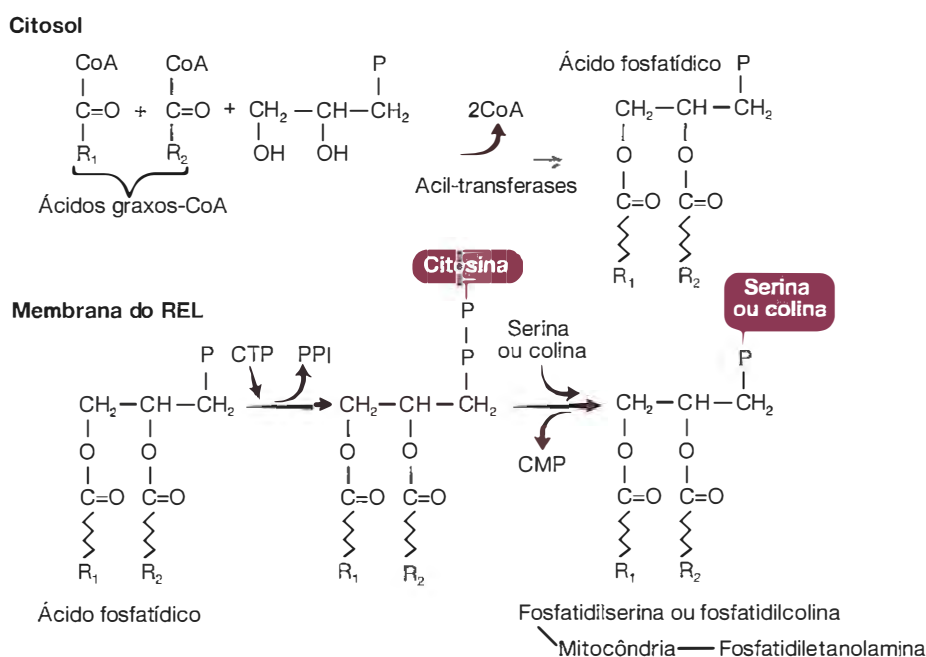



Figura 10.10 ▪ Os fosfolipídios são sintetizados no citosol a partir de duas moléculas de ácidos graxos-CoA e uma molécula de glicerol, formando o ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico é inserido na face citosólica da membrana do REL, onde recebe diferentes grupos polares, formando a fosfatidilcolina ou fosfatidilserina. Os fosfolipídios formados na face citosólica do REL são transferidos para a face luminal pela ação das flipases.

função semelhante é realizada pelas escramblases (do inglês *scramble*, misturar), que transferem os fosfolipídios entre as monocamadas, mantendo a assimetria dos lipídios na membrana.

Além dos fosfolipídios, também o colesterol e a ceramida são sintetizados nas membranas do retículo, em um processo que envolve as cadeias de transporte de elétrons do citocromo P450 e do citocromo b_5. O colesterol é sintetizado a partir do acetato, que, nas membranas dos hepatócitos, leva à síntese dos ácidos biliares. Nas células que sintetizam hormônios esteroides, como as células intersticiais do testículo, do corpo lúteo do ovário e da glândula adrenal, o colesterol é convertido em progesterona, testosterona, estradiol ou desoxicorticosterona, em um processo que envolve a ação conjunta de enzimas encontradas não somente nas membranas do REL, mas também na membrana das mitocôndrias. Essa colaboração metabólica entre as duas organelas explica a abundância desses dois componentes celulares e sua proximidade nas células que sintetizam esteroides (Figura 10.11). A ceramida, por sua vez, é convertida em glicolipídio ou em esfingomielina por enzimas encontradas no complexo de Golgi, como será discutido mais adiante.

Ainda no retículo liso ocorrem a elongação e a dessaturação de ácidos graxos. Esse processo inicia-se no citosol com a síntese do ácido palmítico, o qual cresce em comprimento pela adição sucessiva de malonil-CoA. Na dessaturação, a formação da dupla ligação ocorre graças à utilização de uma molécula de oxigênio (O_2), que recebe elétrons da cadeia transportadora de elétrons da qual participam o citocromo b_5 e sua redutase.

Nas células epiteliais de absorção do intestino delgado, o REL sintetiza triglicerídios a partir dos ácidos graxos e glicerol provenientes dos nutrientes encontrados no lúmen do intestino delgado e absorvidos por essas células. Em seguida, as moléculas de triglicerídios sintetizadas no REL são transferidas para o meio extracelular do tecido conjuntivo subjacente às células epiteliais, sendo de lá carregadas pelo sangue e pela linfa para serem distribuídas pelo organismo.

O REL participa da desintoxicação no organismo

O organismo tem a capacidade de converter substâncias tóxicas, como herbicidas, desfolhantes, conservantes e corantes alimentares, medicamentos ou dejetos industriais, em substâncias inócuas ou de fácil excreção.

Esse processo ocorre no fígado, na pele, nos rins e nos pulmões e dele participam o citocromo P450 e sua redutase, que contém um grupamento Fe-S (ferro-enxofre) (Figura 10.6). O citocromo P450 catalisa reações de hidroxilação nas quais um substrato orgânico (RH) é hidroxilado a R-OH, pela incorporação de um átomo de oxigênio (O_2). O outro átomo de oxigênio é reduzido a H_2O pela transferência de elétrons do NADH ou NADPH, que são capturados pela citocromo P450 redutase e transferidos ao citocromo P450 (Figura 10.12). A hidroxilação de um composto tóxico aumenta sua solubilidade em água e, consequentemente, facilita sua eliminação do corpo.

A ingestão de barbitúricos promove acentuado aumento na quantidade de retículo liso das células hepáticas e até o RER perde os ribossomos acopla-

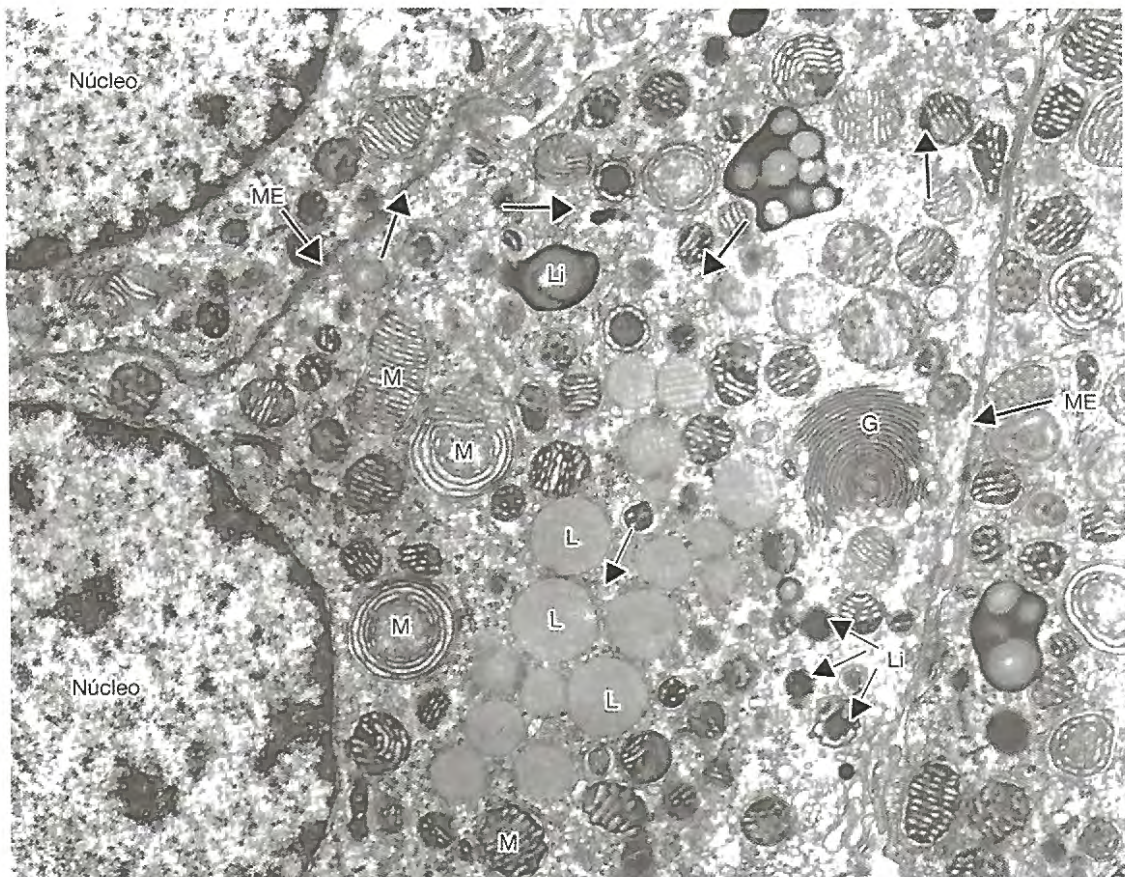



Figura 10.11 ▪ Eletromicrografia de partes de duas células da região cortical da glândula adrenal. Estas células produzem hormônios esteroides. *À esquerda*, dois núcleos celulares. Nos citoplasmas, note o acúmulo de gotículas de lipídios (L), mitocôndrias (M) e lisossomos (Li). O retículo endoplasmático liso é abundante (*setas*). Nestas células, o aparelho de Golgi (G) é constituído por muitos sáculos achatados e dispostos em semicírculo. ME indica as membranas das duas células contíguas. 14.000x.

dos às suas membranas e transforma-se em REL. Análises bioquímicas dessas células demonstraram um aumento da atividade das enzimas que metabolizam os barbitúricos e outros compostos tóxicos e também que essa atividade está localizada nas membranas do retículo liso. O aumento do REL, por ação de fármacos, contribui para a redução do efeito de determinados medicamentos, após determinado tempo de uso. Nesses casos, ocorre um aumento tal na atividade das enzimas do sistema de desintoxicação que há necessidade de doses maiores para promover o mesmo efeito obtido, no início, com doses pequenas, pois uma parte considerável do fármaco é destruída no fígado.

É também no retículo liso das células do fígado que é solubilizado o pigmento da bile (bilirrubina) em razão da ação da enzima glicuronil-transferase, tornando possível que a bilirrubina, na sua forma solúvel, seja secretada pelas células hepáticas, sendo eliminada do fígado pela bile. Quando há deficiência de glicuronil-transferase, os pacientes acumulam bilirrubina insolúvel no sangue e tornam-se ictéricos (esse tipo de icterícia chama-se doença de Crigler-Najjar). Com base na observação de que os barbitúricos estimulam a síntese das enzimas do retículo endoplasmático liso, a administração de barbitúricos é utilizada no tratamento desse tipo de icterícia. Nessa doença, que pode ser decorrente de diversas causas, há um aumento de bilirrubina no sangue, com acúmulo desse pigmento na pele e em outros locais, tornando a aparência do doente amarelada.

Participação na metabolização do glicogênio

Uma função importante do REL de hepatócitos e de células renais é a glicogenólise, ou seja, a obtenção de glicose a partir do glicogênio. Esse processo ocorre pela ação consecutiva de quatro enzimas, das quais apenas uma está localizada no REL, enquanto as demais etapas são citosólicas. A glicose-6-fosfatase é uma proteína intrínseca da membrana do retículo, que contém nove hélices transmembranosas, com seu sítio ativo voltado para a face luminal da membrana (Figura 10.6). A glicose-6-fosfato obtida do glicogênio pela ação de enzimas citosólicas é transportada para o interior da cisterna do RE por um transportador específico (T1) encontrado na membrana. Uma vez na cisterna, a glicose-6-fosfatase remove o fosfato da glicose-6-fosfato, liberando glicose e fosfato inorgânico (Pi), que são transportados de volta para o citosol por dois transportadores diferentes (T2 e T3). A glicose assim formada pode, então, deixar a célula por outro transportador. Esse processo é importante para isolar e liberar, para a corrente sanguínea, a glicose que será utilizada como fonte de energia em outros tecidos. Se a glicose-6-fosfato permanecesse livre no citosol, ela poderia ser utilizada no processo de glicólise pela própria célula. Assim, em células como o hepatócito, observa-se uma proximidade do REL com depósitos de glicogênio do citosol.

Os acúmulos citoplasmáticos de glicogênio variam muito em quantidade, conforme o tipo celular e seu estado funcional. Em determinadas células, como nas do fígado e músculo estriado de mamíferos bem alimentados, podem ocorrer extensos depósitos desse polissacarídio. O glicogênio hepático, que pode chegar a 10% do peso do fígado (150 g de glicogênio em um fígado humano), é degradado no intervalo das refeições para manter constante o nível de glicose no sangue (glicemia), fornecendo essa molécula energética para as outras células do organismo. A glicose originada do glicogênio das células musculares, no entanto, é praticamente totalmente utilizada como fonte de energia para a contração muscular, não contribuindo significativamente para a glicemia.

O REL armazena, libera e capta íons Ca^{2+}

O retículo endoplasmático liso é o principal reservatório de Ca^{2+} do citoplasma de células musculares e não musculares. Sabe-se que o Ca^{2+} regula a maioria dos processos metabólicos que ocorrem nas células e que, portanto, elas desenvolveram um sistema capaz de controlar os níveis intracelulares desse íon. Há proteínas intrínsecas às membranas do REL que funcionam como canais, e outras como bombas de Ca^{2+}. Dependendo do estímulo recebido pela célula, essas proteínas liberam Ca^{2+} para o citoplasma ou captam esses íons para o interior das cisternas do RE. Nas cisternas do REL, a maior parte dos íons Ca^{2+} está ligada a proteínas solúveis, tais como a calsequestrina e as chaperonas calreticulina, BiP e dissulfeto-isomerase. A calsequestrina é a principal responsável pela ligação de Ca^{2+} no músculo estriado esquelético, enquanto a calreticulina o faz nas células não musculares.

A concentração desse íon no citosol é muito baixa, sendo, porém, aumentada em resposta ao estímulo fornecido por sinais químicos. Por exemplo, quando as células musculares estriadas são estimuladas pelos neurotransmissores liberados nas placas motoras, o Ca^{2+} sai do retículo pelos canais de cálcio e promove a contração das miofibrilas, levando à contração da célula muscular inteira. Cessado o estímulo, os íons Ca^{2+} são levados de volta às cisternas do retículo liso, por processo ativo, isto é, que consome energia do ATP.

Exportação de lipídios do REL

Do retículo liso, os lipídios são distribuídos para as diversas membranas celulares por três mecanismos principais: (1) são incorporados à membrana do próprio retículo e se difundem

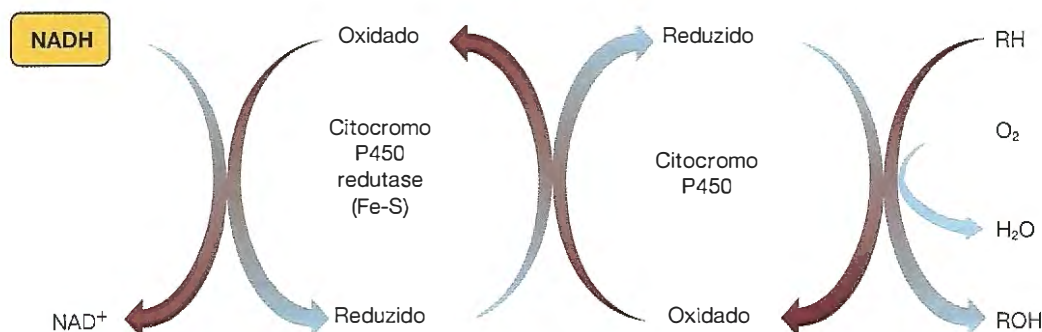



Figura 10.12 ▪ Esquema das reações de hidroxilação catalisadas pelo citocromo P450 e sua redutase. A redutase contém um grupamento Fe-S que recebe os elétrons do NAD ou do NADP e os transfere para o citocromo P450. Essas reações de oxidorredução levam à hidroxilação do substrato orgânico (RH) a R-OH, pela incorporação de um átomo de oxigênio (O_2), e à formação de H_2O.

pela bicamada; (2) integram as membranas de vesículas que brotam do retículo e se fundem com outros compartimentos; ou (3) são transportados por proteínas específicas. Pertencem ao primeiro grupo os lipídios que irão compor as membranas de ambos os tipos de retículo e do envoltório nuclear. As moléculas de lipídios distribuídas por vesículas transportadoras são destinadas para as membranas do complexo de Golgi, dos lisossomos, dos endossomos e para a membrana plasmática. Por outro lado, as moléculas que constituirão as membranas das mitocôndrias, plastos e peroxissomos são exportadas do REL pelas proteínas transportadoras de lipídios (LTP – do inglês *lipid transfer protein*), que são moléculas com aproximadamente 24 kDa. Várias LTP já foram caracterizadas, assim como os lipídios que elas reconhecem; dentre elas, podemos citar a CERT, que transporta ceramida; a GLTP, que transfere glicolipídios; a FAPP2, que atua sobre glicosilceramida; a StAR, responsável pelo transporte de colesterol; e as PITPα e β que transportam fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. As LTP são moléculas solúveis, anfipáticas, que contêm aminoácidos hidrofílicos expostos na superfície que faz contato com o citosol e uma cavidade hidrofóbica na qual se aloja a molécula de lipídio a ser transportada (Figura 10.13). Elas apresentam uma estrutura em forma de tampa que funciona como um portão para a entrada do lipídio. Alterações conformacionais da LTP levam ao movimento da tampa, de uma forma "aberta" ou "fechada", o que possibilita a ligação ou a liberação do lipídio. As proteínas transportadoras têm domínios que reconhecem especificamente os lipídios encontrados na membrana do REL, ligam-se a ele, retiram-no da membrana e fazem o seu transporte por meio do citosol. Quando o complexo proteína transportadora-lipídio encontra outra membrana, a proteína insere o lipídio na nova bicamada lipídica (Figura 10.13). Esse transporte se faz a partir de uma membrana rica em determinado tipo de lipídio – no caso, a membrana do retículo endoplasmático liso – para outra, pobre naquele lipídio, que podem ser as membranas dos peroxissomos, das mitocôndrias ou dos plastídios.

A transferência dos lipídios ocorre ao acaso, o que possibilita supor que existam mecanismos mais complexos de transporte.

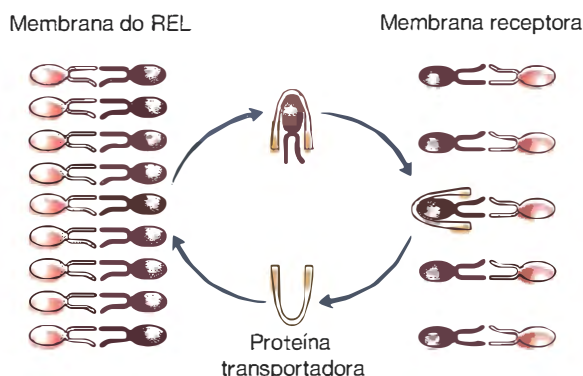



Figura 10.13 ▪ Os lipídios que constituirão as membranas dos peroxissomos, mitocôndrias ou plastos são sintetizados nas membranas do REL e carregados para os compartimentos-alvo pelas proteínas transportadoras de lipídios (LTP). As LTP apresentam uma estrutura em forma de tampa, que se abre quando elas sofrem alterações conformacionais, possibilitando que o lipídio a ser transportado tenha acesso à cavidade hidrofóbica da LTP e possa assim ser transportado por meio do citosol. Quando o complexo LTP-lipídio encontra a membrana-alvo, a proteína insere o lipídio na bicamada lipídica.

As LTP são muito importantes para a saúde humana, uma vez que mutações nos genes que codificam essas proteínas causam doenças graves. Um exemplo conhecido é a mutação no gene que codifica a proteína StAR, que leva à hiperplasia congênita da adrenal, uma doença na qual a síntese de esteroides é prejudicada, com o consequente acúmulo do colesterol (precursor de esteroides).

Complexo de Golgi

O complexo de Golgi foi descrito em 1898 pelo biólogo italiano Camilo Golgi, em tecido nervoso contrastado com tetróxido de ósmio (OsO_4). Essa técnica, bem como a impregnação com nitrato de prata, possibilita evidenciar o complexo de Golgi no microscópio de luz, no qual aparece como uma estrutura enovelada, de forma irregular (Figura 10.14).

A localização do complexo de Golgi varia de acordo com o tipo e a função da célula. Em geral, quando é uma estrutura única no citoplasma, localiza-se em uma região determinada, quase sempre ao lado do núcleo e perto dos centríolos (Figura 10.15). Nas células secretoras, por outro lado, é muito desenvolvido e situado entre o núcleo e os grânulos de secreção. Em outras células, aparece sob a forma de vários agregados que circundam o núcleo, como nos neurônios, ou se espalham pelo citoplasma, como nas células vegetais. Seu tamanho varia muito, podendo ser pequeno, como ocorre na célula muscular, médio, como nas células enteroendócrinas (células argentafins), e grande, como nas células que secretam glicoproteínas. A Figura 10.16 mostra complexos de Golgi de dois tipos celulares.

O complexo de Golgi é formado por vários compartimentos em sequência

Não foi possível estabelecer a estrutura do complexo de Golgi pela microscopia de luz; apenas com o advento da

Figura 10.14 ▪ Fotomicrografia de corte de epidídimo que mostra complexos de Golgi impregnados pela prata.

microscopia eletrônica (Figuras 10.15 e 10.16) isso ocorreu. Ele é constituído por estruturas semelhantes a sacos membranosos, achatados e empilhados. Estas são as cisternas do complexo de Golgi, revestidas por membranas. Na maioria das células eucariontes, cada pilha apresenta de três a oito sáculos. Em algumas algas pardas, no entanto, existem pilhas com até 20 sáculos. O número de pilhas varia de célula para célula. Algumas células animais contêm um único sáculo grande, enquanto algumas células vegetais contêm dezenas de pequenas pilhas de sáculos. A pilha de sáculos frequentemente apresenta-se curva, adquirindo, em conjunto, a forma de uma cuia, com uma face côncava, voltada para a membrana plasmática, e a outra convexa, voltada para o retículo.

Ao microscópio eletrônico, observam-se muitas vesículas esféricas, com diâmetro médio de 60 nm, associadas aos sáculos do Golgi (Figuras 10.15 e 10.16). Parte dessas vesículas transporta material do retículo endoplasmático para o Golgi, enquanto outras podem estar envolvidas no transporte de uma cisterna do Golgi para outra e, também, do Golgi para outras organelas. Por suas funções, são genericamente denominadas vesículas transportadoras. Cada pilha de cisternas com suas vesículas associadas constitui uma unidade do complexo de Golgi, que recebe o nome de dictiossomo.

Cada pilha de sáculos do complexo de Golgi apresenta polaridade tanto de estrutura quanto de função, como se fosse constituída por mais de uma organela arranjada em sequência. A face convexa é chamada de face *cis* (*cis* significa aquém de) ou face proximal, por estar, geralmente, mais próxima ao núcleo celular e ao RE. Em contraposição, a face oposta, côncava, é denominada face *trans* (*trans* significa além de) ou face distal, por ser a mais distante do núcleo ou do RE e estar voltada para a membrana plasmática. As cisternas localizadas entre essas duas faces constituem as cisternas médias (Figura 10.17). Associados à face *cis* e à *trans* encontram-se compartimentos compostos por uma rede de cisternas tubulares, que constituem, respectivamente, a rede *cis* do Golgi e a rede *trans* do Golgi. As vesículas que brotam do elemento transicional do RE fundem-se, estabelecendo o compartimento intermediário RE-Golgi. Os vários compartimentos intermediários, por sua vez, movem-se, associados a microtúbulos, em direção aos sáculos do Golgi e se fundem para formar a rede *cis* do Golgi. As proteínas que estão em processo de síntese e secreção passam pelos diversos sacos golgianos, nos quais sofrem modificações e, finalmente, vesículas contendo as proteínas processadas brotam da rede *trans* do Golgi. Não se conhece o processo exato de transporte entre as várias cisternas; sugere-se que seja feito por meio de vesículas que brotam de uma cisterna e se fundem com a seguinte. O Golgi é, assim, constituído por pelo menos três compartimentos funcionalmente diferentes.

As membranas dos sáculos golgianos apresentam diferentes composições enzimáticas

Uma das maneiras de estudar o complexo de Golgi é por meio do isolamento de seus constituintes, pela técnica da centrifugação fracionada. Como já mencionado neste e em outros

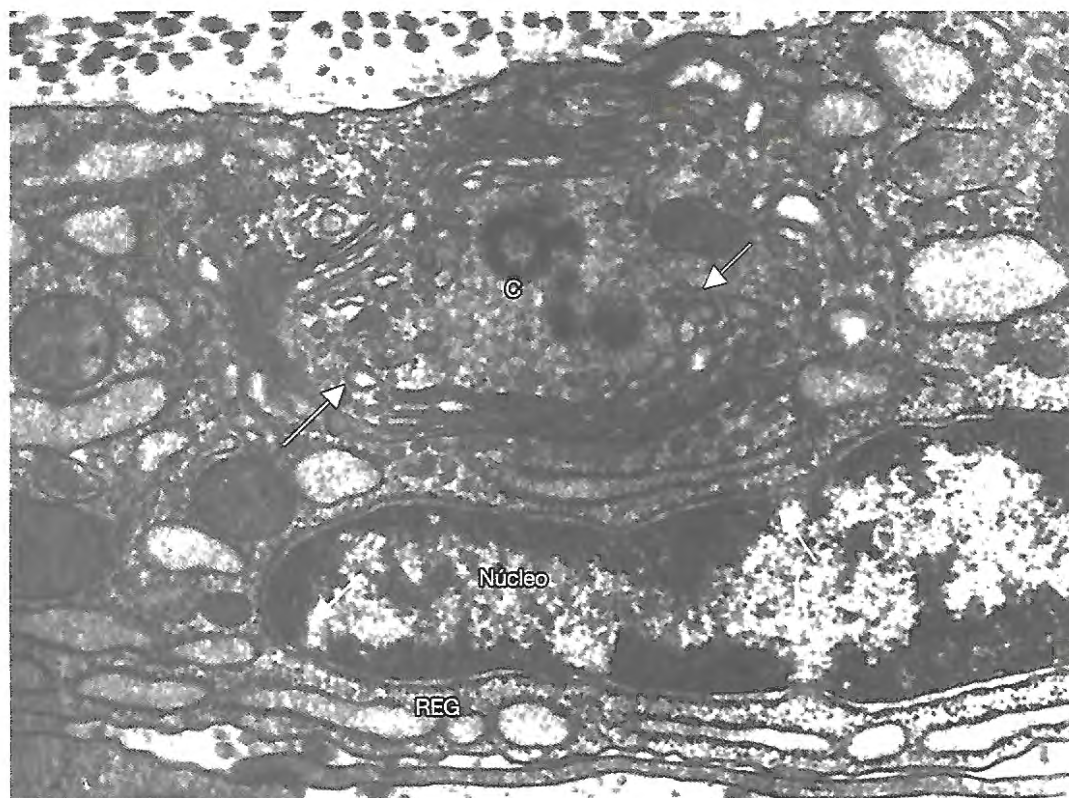



Figura 10.15 ▪ Eletromicrografia de plasmócito, que produz glicoproteínas com a função de anticorpos. O REG é abundante, e suas cisternas contêm proteínas, que aparecem como um material granular. O núcleo apresenta dupla membrana, sendo a face citoplasmática da membrana externa revestida por ribossomos. A cromatina nuclear se condensa perto da membrana, respeitando o local dos poros nucleares (*setas*). Acima do núcleo, um nítido complexo de Golgi circular envolvendo um par de centríolos (C). Pequenas vesículas afluem para as membranas do Golgi. Nas porções laterais do Golgi, notam-se vesículas dilatadas que se destacam das suas membranas (*setas*). Trata-se de exemplo de uma célula que sintetiza e exporta, mas não acumula proteína. 40.000x.

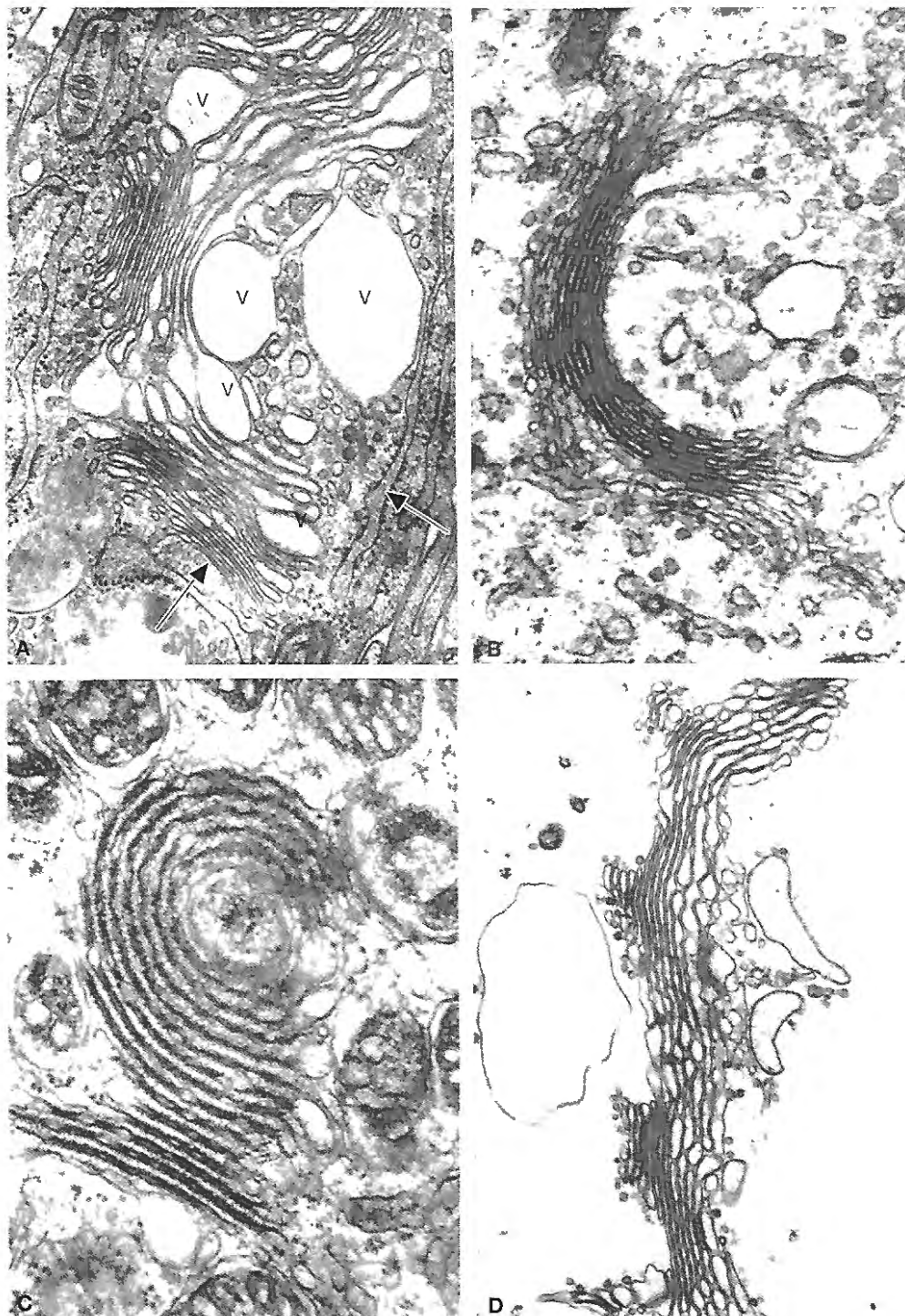



Figura 10.16 ▪ Eletromicrografias de complexos de Golgi de dois tipos celulares. **A.** Golgi da célula secretora de muco (célula caliciforme do intestino). Observe, especialmente *à direita*, o retículo endoplasmático rugoso que, em determinadas regiões, perde os ribossomos, transformando-se em retículo liso (*setas*). *À esquerda*, vesículas transportadoras confluem para o aparelho de Golgi e, do lado oposto, saem vesículas grandes (V). 40.000×. **B.** Aparelho de Golgi de célula do testículo. Note como os sacos membranosos estão dispostos compactamente. 30.000×.

capítulos, a terceira fração obtida com a técnica contém vesículas do retículo liso, do retículo rugoso e vesículas golgianas. Se essa fração é centrifugada em baixa velocidade, obtêm-se muito mais componentes golgianos que de retículo. Assim, pode ser determinada a composição química das membranas e os conteúdos dos sáculos golgianos.

As membranas do complexo de Golgi, como as demais membranas biológicas, são lipoproteicas, contendo em torno de 40% de lipídios e 60 a 65% de proteínas. Os fosfolipídios constituem aproximadamente 55% do total de lipídios e são representados por fosfatidilcolina (45%), esfingomielina (12%), fosfatidiletanolamina (17 a 19%), fosfatidilinositol (8 a 9%) e fosfatidilserina (3 a 4%). O segundo grupo mais abundante, em torno de 35%, é representado por lipídios apolares, seguido por 7% de esteróis (colesterol e seus derivados). Foram caracterizadas cerca de 30 cadeias polipeptídicas diferentes nessas membranas, sendo algumas delas glicosiladas. Há controvérsias, no entanto, se algumas dessas proteínas são residentes das

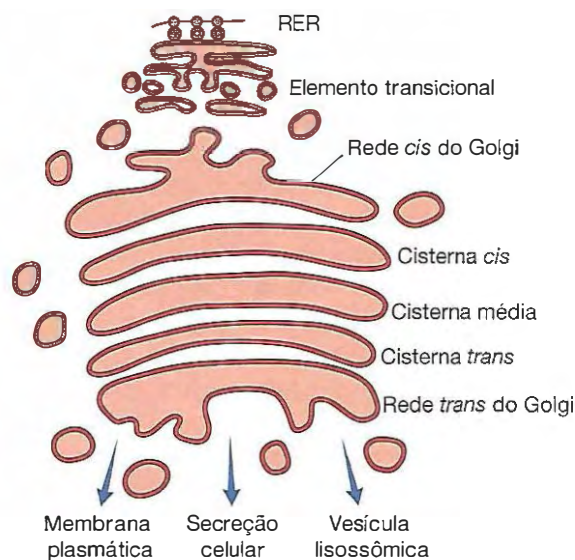



Figura 10.17 ▪ Esquema que mostra os vários compartimentos do complexo de Golgi, bem como sua relação com o retículo endoplasmático rugoso. As proteínas sintetizadas no RER são transportadas para o Golgi no interior das vesículas transportadoras ou de transição, que se fundem estabelecendo o elemento transicional do RER, que por sua vez se funde com as membranas da rede *cis* do Golgi. Esse material é modificado à medida que passa pelas várias cisternas golgianas, o que determina suas destinações finais na célula. As vesículas que brotam da rede *trans* do Golgi contêm, no seu interior, as proteínas destinadas a compor a membrana plasmática, os lisossomos ou a serem secretadas pela célula.

membranas golgianas ou se constituem proteínas em trânsito entre as cisternas. Muitas das proteínas residentes são enzimas relacionadas com a glicosilação (glicosiltransferases), sulfatação (sulfotransferases) e fosforilação (fosfotransferases) de substratos.

O conteúdo das cisternas do complexo de Golgi varia muito de acordo com o tipo celular e com o estado funcional da célula em estudo. Em alguns tipos celulares, como nas células acinosas do pâncreas, as cavidades apresentam-se constituídas por uma solução aquosa rica em glicoproteínas, enquanto em outros, como nas células meristemáticas da raiz de vegetais superiores, são ricas em polissacarídios.

Estudos *in situ*, por meio da detecção da atividade de enzimas encontradas nas membranas ou cavidades do complexo de Golgi, possibilitaram estabelecer que os vários sáculos golgianos apresentam diferentes conteúdos enzimáticos, refletindo diferenças de função entre eles. As atividades de fosfatase ácida estão mais concentradas na face *cis*, sendo impossível determinar se essa enzima está presente nas membranas ou no interior das cavidades. A sulfatação de proteínas e de lipídios ocorre pela ação de sulfotransferases que estão presentes nas cisternas médias. Por outro lado, a atividade da tiaminopirofosfatase (TPPase) é detectada na face *trans*, sendo essa enzima considerada, em algumas células, como marcadora da organela.

No complexo de Golgi, as macromoléculas sofrem modificações adicionais

As alterações pós-traducionais modificam profundamente as características funcionais das moléculas proteicas, contribuindo muito para gerar a variedade de proteínas existente nas células. Além das modificações que sofrem ainda no RE, logo após sua síntese, e que influem na sua forma tridimensional, as moléculas proteicas podem passar por outros tipos de alterações que levam ao estabelecimento de moléculas funcionais.

Nas cisternas do Golgi, ocorrem a hidrólise parcial da fração glicídica das glicoproteínas e a adição de novos açúcares, cuja composição varia com o tipo de glicoproteína que está sendo sintetizada. Esse processo, chamado de glicosilação terminal, resulta na síntese de glicoproteínas com composição química e destino diversos, conforme o tipo de glicosilação que sofrem. Nesse processo, formam-se dois tipos gerais de oligossacarídios N-ligados: os oligossacarídios complexos e os oligossacarídios ricos em manose. Os oligossacarídios complexos formam-se pela retirada de alguns resíduos de açúcar e pela adição de outros, tais como galactose e ácido siálico. Aos oligossacarídios ricos em manose, por sua vez, não são adicionados outros resíduos de açúcar e eles mantêm o mesmo número de açúcares transferido no RE.

No complexo de Golgi ocorre, também, a adição de oligossacarídios em grupamentos OH de aminoácidos treonina ou serina presentes na cadeia polipeptídica, formando os oligossacarídios O-ligados.

O processamento das proteínas destinadas ao interior dos lisossomos difere daquele de proteínas que serão secretadas ou que irão compor a membrana plasmática. As proteínas solúveis dos lisossomos são modificadas pela fosforilação do carbono que ocupa a posição 6 de um resíduo de manose, quando a proteína está na rede *cis* do Golgi. As proteínas assim marcadas com resíduos de manose-6-fosfato são reconhecidas por receptores encontrados na rede *trans* golgiana, os quais dirigem o transporte dessas proteínas para os lisossomos (Figura 10.17). A enzima responsável pela fosforilação da manose é uma fosfotransferase que reconhece um domínio específico na cadeia proteica e adiciona glicosaminas fosforiladas aos oligossacarídios ligados a ela. Em seguida, a glicosamina é removida, restando o fosfato ligado à manose.

É também no complexo de Golgi que ocorre a síntese da porção glicídica das proteoglicanas, que são componentes da matriz também presentes na superfície celular. No Golgi são polimerizadas as glicosaminoglicanas que se ligam à proteína para formar a proteoglicana.

Nas células vegetais, o complexo de Golgi está envolvido na síntese das glicoproteínas e dos componentes glicídicos da parede celulósica. A parede das células vegetais é composta de três classes de polissacarídios: celulose, hemicelulose e pectina. A celulose é a única sintetizada na superfície celular pelo complexo celulose-sintase (Capítulo 13). A hemicelulose e a pectina, por sua vez, são polimerizadas no complexo de Golgi, do qual são transportadas, no interior de vesículas, até a superfície celular.

O complexo de Golgi participa também do metabolismo de lipídios, especificamente da síntese de glicolipídios e esfingomielina. Tanto a esfingomielina quanto os glicolipídios são sintetizados a partir da ceramida e da fosfatidilcolina que foram produzidas no REL. Na síntese da esfingomielina, um grupamento fosforilcolina é ligado à ceramida, enquanto os glicolipídios são formados pela adição de resíduos de açúcares à ceramida. O tipo de açúcar adicionado gera os vários glicolipídios encontrados nas membranas da célula. A esfingomielina é sintetizada na superfície luminal da membrana,

enquanto os resíduos de açúcar dos glicolipídios são adicionados à ceramida no lado citosólico da membrana do Golgi. Resíduos adicionais de açúcares são transferidos para os glicolipídios na face luminal das membranas. Assim, tanto a esfingomielina quanto os glicolipídios são encontrados apenas na hemicamada interna das cisternas golgianas. Esses lipídios são transportados como integrantes da membrana de vesículas. Com a fusão das vesículas com a membrana plasmática, eles tornam-se expostos na superfície externa desta última, na face extracelular.

Nas membranas das cisternas golgianas estão presentes sulfotransferases que são responsáveis pela sulfatação de proteínas, de lipídios e de glicídios, bem como da porção glicídica de glicoproteínas e de glicosaminoglicanas. As glicosaminoglicanas são polissacarídios que constituem a matriz extracelular das células animais, e a sua sulfatação confere o caráter ácido para essas macromoléculas (Capítulo 12). Esse processo é bem evidente nos condrócitos, células da cartilagem que secretam glicosaminoglicanas da matriz extracelular, como o sulfato de dermatana e o de condroitina.

A multiplicidade de eventos pós-traducionais na formação de proteínas apresenta a vantagem de levar a uma diversidade estrutural e funcional das moléculas proteicas traduzidas de um mesmo mRNA. Contudo, esse processo tem seu preço, pois, elevando o número de enzimas envolvidas, aumenta também a incidência de doenças relacionadas com as proteínas em questão, em razão da falência de uma das enzimas envolvidas no processo. O caso da proteína colágeno, encontrada nos ossos, na pele, nos tendões, nos ligamentos etc., é típico, pois se trata de uma família de proteínas que é altamente diversificada, não somente em decorrência de ser codificada por vários genes, mas também porque passa por diversas modificações pós-traducionais, como hidroxilações, glicosilações, proteólises limitadas, formação de estrutura terciária variável etc. Como exemplos ilustrativos das patologias do colágeno, podem ser citadas as síndromes de Ehlers-Danlos, na qual é frequente a presença de pele friável, amolecimento dos ligamentos das articulações (contorcionistas de circo) e lesão do colágeno do olho, vasos e tubo digestivo.

Outra doença consequente de defeito pós-traducional, que pode ser citada como exemplo, é um tipo de diabetes decorrente da não transformação da pós-insulina (inativa) em insulina ativa, em consequência de uma falha no processo de proteólise que ocorre nos grânulos de secreção das células β das ilhotas de Langerhans. O sangue desses doentes contém o pró-hormônio proinsulina, em vez da insulina, que é o hormônio ativo.

Destinação e exportação de macromoléculas

As proteínas, os lipídios e os polissacarídios são transportados do Golgi para seus destinos finais por meio da via secretora. Essa via envolve o empacotamento das macromoléculas em diferentes tipos de vesículas de transporte, que, por sua vez, brotam da rede *trans* do Golgi e liberam seu conteúdo nos locais apropriados. Na ausência de sinais específicos, as proteínas são transportadas para a membrana plasmática por um fluxo contínuo, que transporta proteínas, não seletivamente, do retículo endoplasmático para o Golgi e, então, para a superfície celular. Essa via é responsável pela incorporação de novas proteínas e lipídios à membrana plasmática, bem como pela secreção contínua de proteínas da célula. Para serem desviadas da via de fluxo contínuo, as proteínas devem ser marcadas especificamente para outras destinações, tais como para os lisossomos.

Proteínas que desempenham suas funções no Golgi devem ser retidas nessa organela e não ser transportadas por meio da via secretora. O mecanismo responsável pela retenção de proteínas de membrana no complexo de Golgi parece ser fundamentado nos domínios transmembranosos dessas proteínas. A maioria das proteínas da membrana do Golgi apresenta curtos segmentos transmembranosos em α-hélice, com cerca de 15 aminoácidos, e essas porções devem contribuir para a retenção dessas proteínas no Golgi. Esses sinais encontrados nas proteínas residentes do Golgi são responsáveis pela recuperação dessas proteínas nos compartimentos subsequentes ao longo da via secretora, se elas forem, erroneamente, liberadas do Golgi.

A via de fluxo contínuo ou constitutiva, que ocorre em todas as células, leva à secreção contínua, não regulada, de macromoléculas, em que a célula exocita macromoléculas à medida que as elabora. Exemplos de secreção contínua incluem a secreção do colágeno pelos fibroblastos e das proteínas do soro pelos hepatócitos. Algumas células, no entanto, também contêm uma via secretora regulada, na qual macromoléculas específicas são secretadas em resposta a sinais extracelulares. São exemplos de secreção regulada a liberação de hormônios pelas células endócrinas, a liberação de neurotransmissores pelos neurônios e a liberação de enzimas digestivas pelas células acinosas do pâncreas. As proteínas são selecionadas e têm suas destinações definidas na rede *trans* do Golgi. A seleção de proteínas na via secretora regulada parece envolver o reconhecimento de sequências sinal comuns a diversas proteínas que entram nessa via. Na rede *trans* do Golgi, elas são empacotadas em vesículas secretoras especializadas. Essas vesículas são maiores que as outras vesículas de transporte e estocam seu conteúdo até que sinais específicos levam à sua fusão com a membrana plasmática. Nesse caso, então, o material a ser secretado é acumulado até que um sinal externo dispare sua liberação na superfície celular. Por exemplo, as enzimas digestivas produzidas pelas células acinosas do pâncreas são estocadas em vesículas de secreção até que a presença de comida no estômago e intestino delgado induza a sua secreção. Processo semelhante é observado nas células caliciformes do intestino (Figura 10.18). No momento em que o organismo necessita, o estímulo provoca a extrusão dos grânulos de secreção, por exocitose. Microtúbulos participam desse processo de exocitose. Na Figura 10.19 estão representados os diversos compartimentos envolvidos na secreção celular, bem como a função de cada um deles.

Por outro lado, a formação de lisossomos envolve a síntese de proteínas que irão compor suas membranas, bem como de proteínas solúveis, que ficam nas cavidades do lisossomo. Como já discutido, as proteínas encontradas no lúmen dos lisossomos são marcadas por resíduos de manose-6-fosfato depois que elas entram no complexo de Golgi. Receptores específicos encontrados na membrana da rede *trans* do Golgi, os MPR (do inglês *manose phosphate receptor*), reconhecem a manose-6-fosfato e as proteínas que carregam esses resíduos. Os complexos resultantes da ligação receptor-proteína são empacotados em vesículas de transporte especificamente destinadas aos lisossomos. Essas vesículas fundem-se com os lisossomos, liberando seu conteúdo no interior dessas orga-

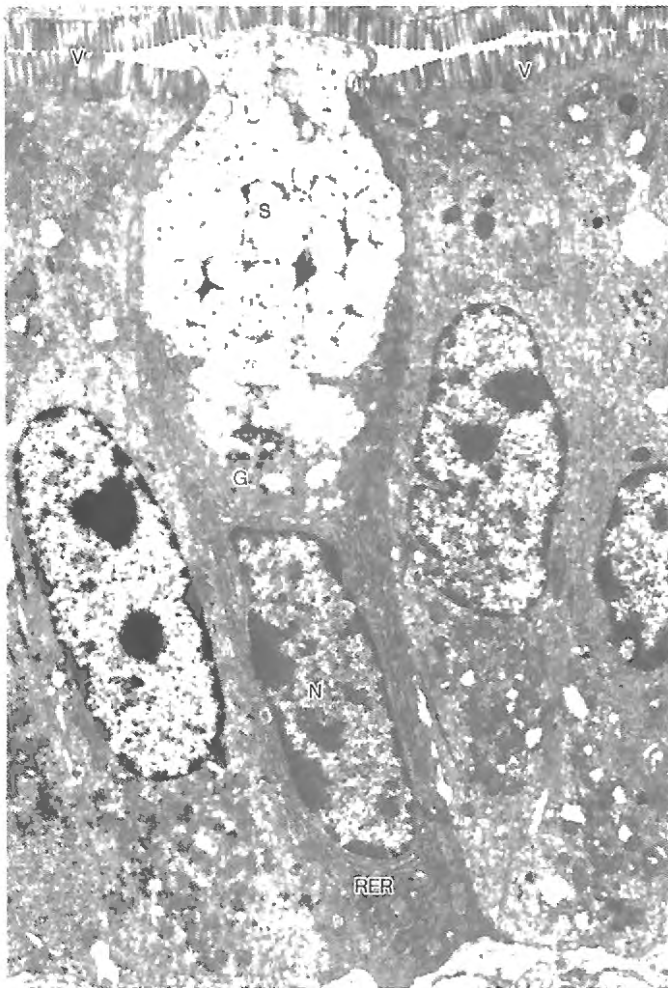



Figura 10.18 ▪ Eletromicrografia de células do intestino delgado. Observe uma célula caliciforme típica, que secreta glicoproteínas. O núcleo (N) localiza-se na base da célula, região rica em retículo endoplasmático rugoso (RER). Logo acima do núcleo, o complexo de Golgi (G). A maior parte da célula é ocupada por grandes grânulos de secreção (S) pouco elétron-densos. Trata-se de uma célula que sintetiza, segrega, acumula e exporta complexos de proteínas e polissacarídios. *Na lateral*, células do intestino, especializadas na absorção de nutrientes, com microvilos na superfície (V). 7.500×.

nelas. As proteínas das membranas lisossômicas, por sua vez, são marcadas por sequências específicas de aminoácidos em suas caudas citoplasmáticas, e não por resíduos de manose-6-fosfato.

Em células vegetais e em fungos, em que as funções dos lisossomos são desempenhadas pelos vacúolos, a destinação de proteínas para os vacúolos se faz por curtas sequências de aminoácidos. Em fungos, foi identificada a sequência Gln-Arg-Pro-Leu como marcadora de proteínas vacuolares, mas outras proteínas vacuolares parecem ter diferentes sinais.

▪ O transporte intracitoplasmático por vesículas diferentes assegura o destino correto das macromoléculas

As moléculas sintetizadas e processadas no RE e no Golgi são transportadas para os mais diferentes compartimentos celulares, no interior de vesículas. As vesículas brotam da membrana de uma organela e se fundem com a membrana de outra ou com a membrana plasmática. Para garantir que as moléculas sejam corretamente destinadas, bem como para manter a composição química e a identidade de cada compartimento da via, é essencial que o processo de brotamento e fusão das vesículas seja perfeitamente regulado. Para assegurar que isso ocorra, a superfície citoplasmática da membrana das vesículas de transporte é recoberta com proteínas, e é essa cobertura proteica que causa a deformação da membrana e dirige o brotamento da vesícula.

Três tipos diferentes de vesículas cobertas foram caracterizados, cada um deles atuando em uma via diferente de transporte (Figura 10.20). Ao primeiro e mais bem caracterizado tipo pertencem as vesículas cobertas pela proteína clatrina, que participam do processo de internalização de macromoléculas do meio extracelular, por endocitose (Capítulo 5), do transporte de enzimas lisossômicas da rede *trans* do Golgi para o endossomo, bem como da reciclagem de receptores de manose-6-fosfato para a rede *trans* do Golgi. Sabe-se que, nas células vegetais, as vesículas cobertas por clatrina estão envolvidas no transporte de proteínas a serem estocadas nos vacúolos.

A proteína clatrina se organiza como uma rede que recobre externamente a membrana (Figura 10.21). Ela se associa à membrana por meio de uma família de proteínas denominadas, no conjunto, de adaptadoras de clatrina. As moléculas adaptadoras de clatrina reconhecem e ligam-se à superfície citosólica dos receptores transmembranosos envolvidos no reconhecimento das moléculas que estão sendo captadas e empacotadas para transporte. Há quatro tipos diferentes de adaptadoras de clatrina já caracterizados, denominados AP1, AP2, AP3 e AP4, sendo que cada um reconhece e se liga especificamente a um determinado receptor. Assim, juntamente com os receptores, elas são responsáveis pelo reconhecimento e pela seleção das moléculas que serão incorporadas em uma determinada vesícula. Um exemplo da especificidade das AP é observado no brotamento das vesículas contendo enzimas lisossômicas. Como já discutido neste capítulo, as proteínas lisossômicas são marcadas com um resíduo de manose-6-fosfato, que, por sua vez, é reconhecido pelo receptor de manose-6-fosfato, MPR, encontrado na membrana da rede *trans* do Golgi. A AP1 liga-se, de um lado, à porção citosólica do MPR, e do outro, à clatrina, direcionando desse modo as proteínas destinadas a compor as vesículas lisossômicas. A interação lateral entre as várias moléculas de AP e de clatrinas causa a deformação e a evaginação da membrana nesse local. A fissão da membrana para a formação da vesícula é feita pela dinamina, uma proteína com atividade de GTPase (que quebra o GTP em GDP). A dinamina se enrola como uma hélice em torno da membrana evaginada e, com a hidrólise do GTP, sofre uma alteração conformacional que causa um estrangulamento na membrana e a liberação da vesícula.

Os outros dois tipos de vesículas são cobertos pela proteína coatômero ou COP (do inglês *coat proteins*, proteínas de cobertura) e brotam do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (Figura 10.20). O isolamento e a caracterização da cobertura destas vesículas revelaram que a COP é constituída por sete cadeias polipeptídicas.

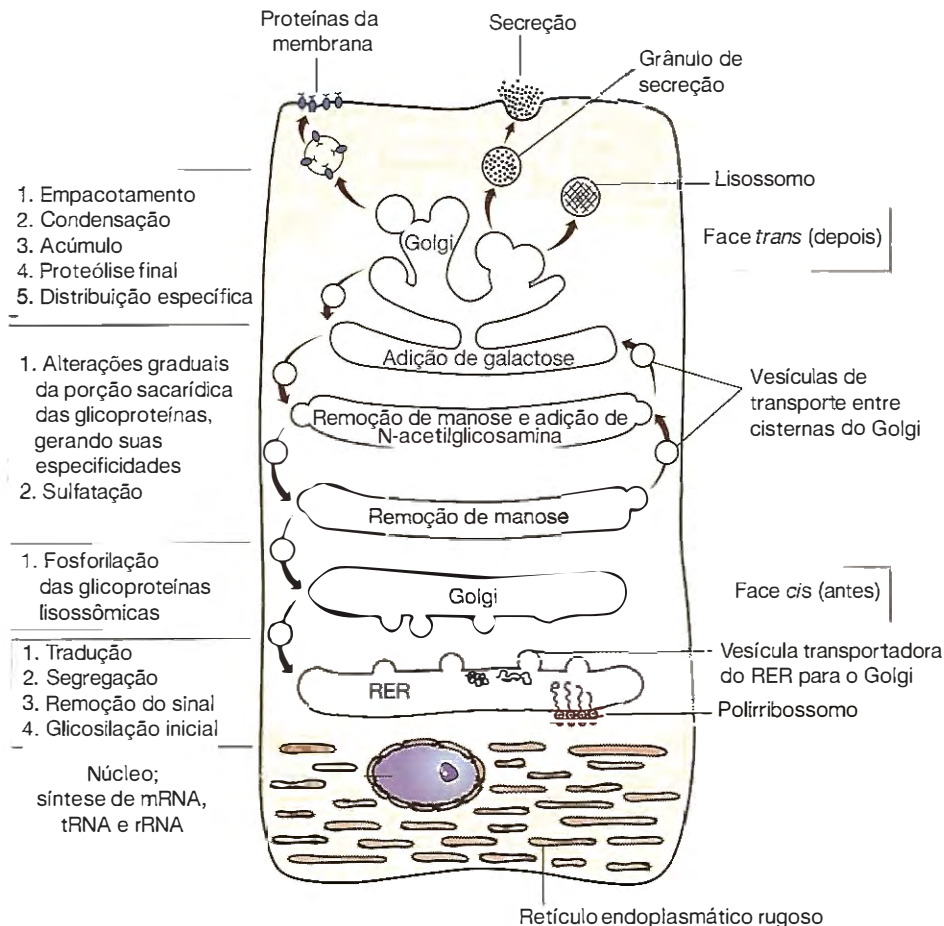



Figura 10.19 ▪ *À direita* deste esquema são apontados os vários compartimentos celulares que participam da secreção. *À esquerda*, ressaltam-se os processos moleculares e funcionais que ocorrem nos respectivos compartimentos. A síntese das glicoproteínas começa no RER, de onde elas são transportadas por vesículas para a rede *cis* do Golgi e, sucessivamente, para os vários compartimentos, até alcançarem o ápice da célula. Observe que a marcação das enzimas lisossômicas começa precocemente, por fosforilação, na rede *cis* do Golgi. As glicoproteínas gradualmente se transformam, por remoções e adições na porção glicídica, formando-se glicoproteínas específicas. Na rede *trans* do Golgi, as glicoproteínas se associam a diferentes tipos de receptores específicos, sendo então levadas aos locais a que se destinam. *À esquerda* do desenho está indicado um fluxo invertido de vesículas, que retorna para a membrana do retículo endoplasmático e devolve moléculas próprias dele que tenham sido, erroneamente, levadas para o Golgi. Observe que o processo, inicialmente inespecífico, torna-se específico no seu final, dirigindo as moléculas para três destinos: membrana plasmática, secreção e lisossomos.

As vesículas cobertas pela COP I brotam do complexo de Golgi e fazem o transporte entre os sáculos golgianos, o transporte anterógrado de moléculas do Golgi para o retículo, a reciclagem de moléculas, tais como receptores, e o transporte para a membrana plasmática. As vesículas cobertas pela COP II, por sua vez, brotam do retículo endoplasmático e fazem o transporte de moléculas do RE para o complexo de Golgi. Vários experimentos sugerem que as moléculas de COP reconhecem domínios citoplasmáticos específicos de proteínas intrínsecas presentes na membrana e ligam-se a esses dominios. Interações laterais entre as várias COP causam a deformação da membrana e o brotamento da vesícula. O recrutamento das moléculas de COP para a membrana requer a ligação de GTP. A hidrólise de GTP a GDP causa a dissociação das moléculas de COP da membrana e a perda da cobertura das vesículas.

Um aspecto importante do transporte por meio de vesículas é que deve haver um reconhecimento específico entre a membrana da vesícula e a membrana com a qual ela deve fundir-se. Além disso, a fusão entre as duas membranas deve processar-se de maneira correta para que a vesícula descarregue seu conteúdo na organela a que se destina. O reconhecimento específico e a fusão subsequente são mediados por proteínas denominadas SNARE. Essas proteínas são intrínsecas às membranas da vesícula e da organela-alvo, constituindo, respectivamente, as v-SNARE e as t-SNARE (a letra *t* refere-se a *target*, do inglês, alvo). As vesículas cobertas brotam de um compartimento apresentando, intrínsecas a suas membranas, proteínas v-SNARE com domínios citoplasmáticos salientes. A vesícula é transportada por microtúbulos até encontrar a membrana-alvo, que contém, por sua vez, proteínas t-SNARE com domínios voltados para a face citoplasmática da membrana. Os domínios v-SNARE reconhecem e se ligam aos domínios t-SNARE das membranas-alvo, formando complexos trans-SNARE que garantem a proximidade entre as duas membranas e a fusão.

Algumas proteínas são processadas no interior das vesículas de secreção

Depois que as vesículas secretoras brotam da rede *trans* do Golgi, sua cobertura é removida e seu conteúdo torna-se bastante concentrado, algumas vezes até cerca de 200 vezes

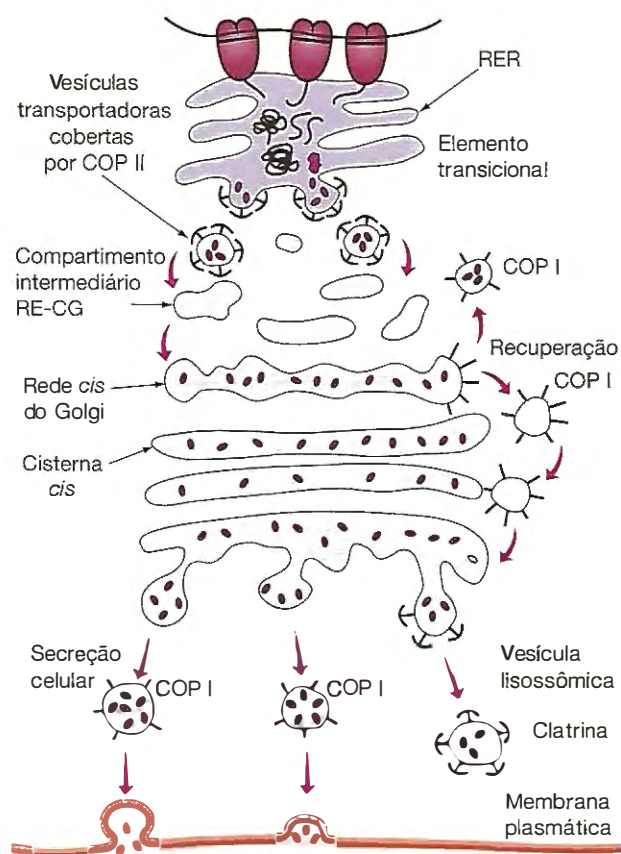



Figura 10.20 ▪ Desenho esquemático que mostra a relação entre o RER e os vários compartimentos do complexo de Golgi na síntese e na destinação das glicoproteínas. Vesículas cobertas por COP II brotam das cisternas do RER e se fundem, formando o elemento transicional, que por sua vez se funde com as membranas da rede *cis* do Golgi. Proteínas que saíram erroneamente do RER são recuperadas no interior de vesículas cobertas por COP I. Essas proteínas sofrem modificações à medida que passam de uma cisterna do Golgi para outra. Esse transporte é feito por vesículas cobertas por COP I. Da rede *trans* do Golgi brotam vesículas cobertas por clatrina, que contêm no seu interior enzimas lisossômicas que foram reconhecidas por receptores de manose-6-fosfato. Vesículas que carregam proteínas que irão compor membrana plasmática ou ser secretadas são recobertas por COP I.

mais concentrado do que no interior das cisternas do Golgi. Essa condensação é, provavelmente, resultante da acidificação do lúmen da vesícula, processo induzido por uma bomba de prótons, encontrada na membrana da vesícula, que consome energia do ATP. Graças a esse processo, as vesículas apresentam conteúdo mais elétron-denso, quando observadas no microscópio eletrônico, constituindo os grânulos de secreção.

A condensação não é o único processamento ao qual as vesículas de secreção estão sujeitas à medida que se tornam prontas para a secreção. Muitos hormônios peptídicos e neuropeptídicos, tanto quanto enzimas hidrolíticas a serem secretadas, são sintetizados como precursores inativos. A formação de moléculas biologicamente ativas envolve uma série de clivagens que começam na rede *trans* do Golgi, continuam nas vesículas secretoras e, algumas vezes, também no meio extracelular, após a secreção. Muitos polipeptídios secretados têm, por exemplo, na sua extremidade aminoterminal, uma pequena sequência sinal que é clivada imediatamente antes da secreção para formar a proteína madura. Essas proteínas são assim sintetizadas como pró-proteínas. Um exemplo bastante

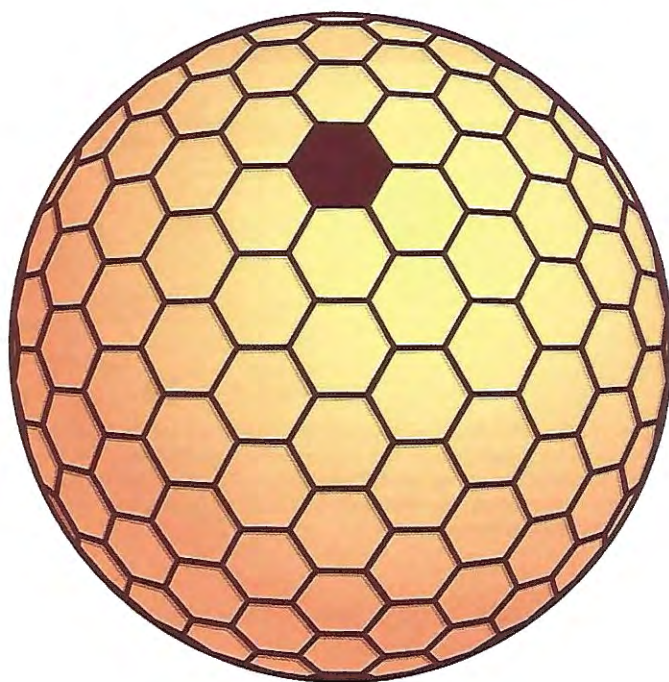



Figura 10.21 ▪ Vesícula coberta, que mostra a capa constituída por uma rede contendo clatrina em arranjo poligonal. Para melhor compreensão, em uma parte da vesícula a rede de clatrina aparece destacada. (Reproduzida, com autorização, de Carneiro, J. Bases Celulares para Fisiopatologia. In: Marcondes, M. *et al.* Clínica Médica, 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio, 1984).

conhecido é a transformação da proinsulina em insulina, que ocorre nas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas.

Em outros casos, várias moléculas de peptídios de sinalização são sintetizadas como partes de uma única poliproteína que atua como um precursor de múltiplos produtos finais individualmente clivados da cadeia polipeptídica inicial; a mesma poliproteína pode ser processada de diferentes maneiras para produzir diversos peptídios em distintos tipos celulares (Figura 10.22).

No caso de enzima hidrolítica secretada ou de alguma proteína cuja atividade possa ser danosa dentro da célula que a produziu, o retardo na ativação da proteína, até que ela atinja uma vesícula secretora ou até depois que ela tenha sido secretada, tem a vantagem de impedi-la de atuar prematuramente dentro da célula.

▪ Vias intracelulares de degradação

A endocitose é o processo pelo qual as células capturam fluidos, macromoléculas e até mesmo outras células, do meio extracelular (Capítulo 5). A internalização de materiais do meio extracelular se faz por invaginações ou evaginações da membrana plasmática, com a consequente formação de vesículas que mergulham no citoplasma. Esse processo promove a retirada de porções da membrana, que não levam ao encolhimento da célula por um mecanismo de compensação com o processo de secreção, no qual ocorre um acréscimo de áreas de membrana pela fusão das vesículas. Assim, há nas células em geral um fluxo constante de membranas, entre a membrana plasmática e a membrana das vesículas de fagocitose, pinocitose e de secreção. As células se mantêm do mesmo

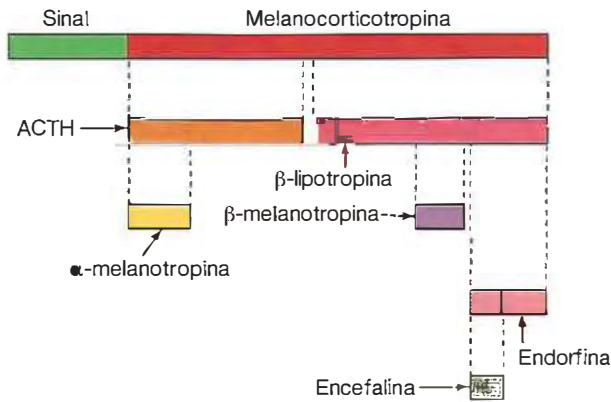



Figura 10.22 ▪ Desenho que ilustra a sequência de proteólises limitadas de uma molécula proteica muito grande, que origina diversas proteínas menores com atividade hormonal. Trata-se de alteração pós-traducional, resultando em aumento no número de proteínas com funções específicas. As linhas tracejadas indicam os locais de ação da protease.

tamanho não pela síntese de nova membrana plasmática, mas pela devolução da membrana retirada.

As diferentes maneiras de interiorização de substâncias fazem com que elas sigam diferentes rotas intracelulares, até alcançarem o compartimento celular no qual ocorre a sua degradação. Nesta seção, abordaremos essas vias de degradação, bem como as organelas envolvidas nesse processo.

Figura 10.23 ▪ Eletromicrografia de célula do córtex da glândula adrenal. Os corpúsculos esféricos e elétron-densos, com regiões mais escuras em seu interior, são lisossomos. A membrana limitante é observada, claramente, nos dois lisossomos centrais. 35.000x.

Os lisossomos contêm enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de biomoléculas

Os lisossomos foram isolados e identificados, pela primeira vez, pela técnica de centrifugação fracionada. Da fração rica em mitocôndrias foi isolada uma subfração que revelava atividade de hidrolases ácidas. Posteriormente – e graças, sobretudo, à técnica citoquímica para demonstração da atividade da fosfatase ácida, uma enzima lisossômica – foi possível a identificação dessas organelas utilizando-se as microscopias de luz e eletrônica.

Os lisossomos são organelas com características morfológicas e dimensões muito variáveis (Figura 10.23), que ocupam cerca de 5% do volume da célula e estão presentes em todas as células animais, com exceção das hemácias. Nas células vegetais, o vacúolo desempenha as funções inerentes aos lisossomos das células animais (Capítulo 13). Cada lisossomo é envolvido por uma unidade de membrana e contém enzimas hidrolíticas com atividade máxima em pH ácido, denominadas, por isso, hidrolases ácidas.

Recentemente, a utilização de técnicas imunocitoquímicas (Capítulo 2) tornou possível estabelecer a composição química da membrana e do conteúdo enzimático dos lisossomos. As membranas contêm fosfolipídios, glicolipídios e colesterol. Várias proteínas estruturais já foram caracterizadas, tais como LAMP-1 e LAMP-2 (do inglês *lysosome-associated membrane proteins*), LIMP (do inglês *lysosomal integral membrane proteins*) e LGP (do inglês *lysosomal membrane glycoproteins*) (Figura 10.24). Essas proteínas são altamente glicosiladas; os oligossacarídios representam cerca de 60% da sua massa total. Algumas delas atuam como transportadoras para monossacarídios, oligossacarídios, aminoácidos, oligopeptídios, nucleotídios etc. Uma proteína transportadora já caracterizada é a cistinosina, que transporta o aminoácido cistina para o interior do lisossomo. A falta dessa transportadora causa cistinose.

A cistinose é uma doença que afeta principalmente o funcionamento dos rins, mas também outros órgãos, e é causada por uma mutação no gene que codifica a cistinosina. Outro transportador identificado é a sialina, que transloca ácido siálico para o interior do lisossomo. Uma mutação no gene que codifica a sialina causa uma doença lisossômica conhecida como doença de Salla.

Intrínseco à membrana lisossômica encontra-se um complexo multienzimático, contendo cerca de 13 cadeias polipeptídicas, que apresenta atividade de ATPase, constituindo-se em uma bomba de prótons (Figura 10.24). Oito dessas cadeias polipeptídicas formam uma unidade funcional voltada para a face citosólica da membrana, e são responsáveis por quebrar o ATP em ADP+Pi. As outras cinco subunidades estão mergulhadas na bicamada lipídica e funcionam como um canal pelo qual os prótons (H^+), resultantes da hidrólise, se difundem para o interior da organela. Esse processo é inverso ao que ocorre nos complexos ATP sintetase encontrados na membrana interna da mitocôndria (Capítulo 4).

Os lisossomos contêm cerca de 40 tipos de enzimas hidrolíticas capazes de digerir quase todas as macromoléculas biológicas, tais como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e oligossacarídios. O elenco de enzimas encontrado nos lisossomos, no entanto, é variável de acordo com o tipo celular e depende da especialização funcional de cada célula. As células seriam facil-

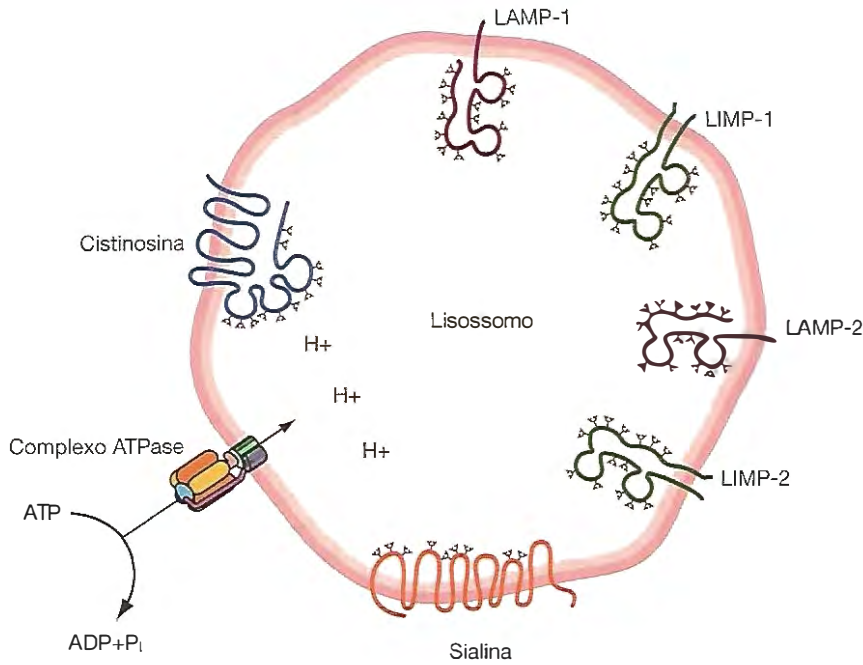



Figura 10.24 ▪ Esquema que ilustra a disposição topológica de várias proteínas intrínsecas que compõem a membrana do lisossomo. Observe que a porção citosólica dessas proteínas é altamente glicosilada. São mostradas também as proteínas sialina e cistinosina, que transportam, respectivamente, ácido siálico e cistina. As cadeias polipeptídicas que quebram o ATP e compõem o complexo ATPase ficam voltadas para o citosol, enquanto aquelas pelas quais os prótons se difundem ficam mergulhadas na bicamada lipídica.

mente destruídas se essas enzimas não estivessem contidas em uma organela envolta por membrana. Acredita-se que o alto teor de oligossacarídios ligados à face luminal da sua membrana protege-a da ação das enzimas hidrolíticas. O fato de as enzimas lisossômicas serem ativas em pH ácido, enquanto o pH do citosol é neutro, constitui uma proteção adicional contra os efeitos dessas enzimas na ocorrência eventual de ruptura de lisossomos.

Os lisossomos recebem substâncias extracelulares por endocitose e material intracelular pela via biossintética e por autofagia. Graças às suas funções na degradação dos diferentes materiais internalizados e intracelulares, eles são organelas chave na manutenção da homeostase celular.

▪ Via endocítica

A via endocítica é responsável pela interiorização e degradação de material extracelular, bem como pela reciclagem de proteínas e lipídios, juntamente com o "*turn-over*" de componentes da membrana celular. Seguem essa via moléculas captadas por pinocitose mediada ou não por receptores, ou seja, que podem ou não ser especificamente reconhecidas por receptores encontrados na membrana plasmática da célula. Na superfície celular, ocorrem o reconhecimento e a ligação entre os receptores e a molécula a ser endocitada. À superfície citosólica da membrana ligam-se as moléculas AP2 (adaptadoras de clatrina) e as clatrinas, que causam um rearranjo e a subsequente invaginação da membrana, formando as vesículas de endocitose, com diâmetros menores que 100 nm. Essas vesículas mergulham no citoplasma e se fundem com o compartimento endossômico (Figura 10.25).

O compartimento endossômico é constituído por um conjunto pleomórfico de túbulos e vesículas de diferentes tamanhos, encontrado desde a periferia do citoplasma até as proximidades do complexo de Golgi e do núcleo. As membranas do compartimento endossômico possuem também, como os lisossomos, bombas de prótons que quebram o ATP e bombeiam H^+ para o interior da cisterna, causando sua acidificação.

As vesículas de endocitose fundem-se, inicialmente, com os endossomos precoces (*early endosomes*), cujo interior é mais ácido (pH 6,5) que o citosol, resultando, na maioria das vezes, na separação entre alguns receptores e as moléculas endocitadas (Figura 10.25). Assim, a função primária do endossomo é separar receptores de membrana, como os da membrana plasmática, possibilitando a reciclagem destes para outros compartimentos celulares. Do endossomo precoce brotam os endossomos de reciclagem, que têm formato tubular e carregam os receptores de volta para a membrana plasmática. Os receptores que ainda permanecem ligados às moléculas endocitadas são sequestrados em pequenas vesículas intraluminais (ILV – do inglês *intraluminal vesicles*), com diâmetros de 50 a 80 nm, que brotam da membrana limitante para a luz do endossomo (Figura 10.25). Ali, parte delas é degradada, o que causa uma diminuição no número de receptores da membrana e, consequentemente na capacidade de resposta da célula a determinadas moléculas. Esse processo constitui a infrarregulação e é um dos eventos responsáveis por alguns casos de tolerância do organismo a fármacos. Na sequência, do endossomo precoce formam-se as vesículas endossômicas carreadoras (ECV), com cerca de 0,5 μm de diâmetro, que contêm as moléculas endocitadas e algumas vesículas intraluminais. As ECV são transportadas por microtúbulos até alcançarem os endossomos tardios (*late endosomes*), com os quais se fundem

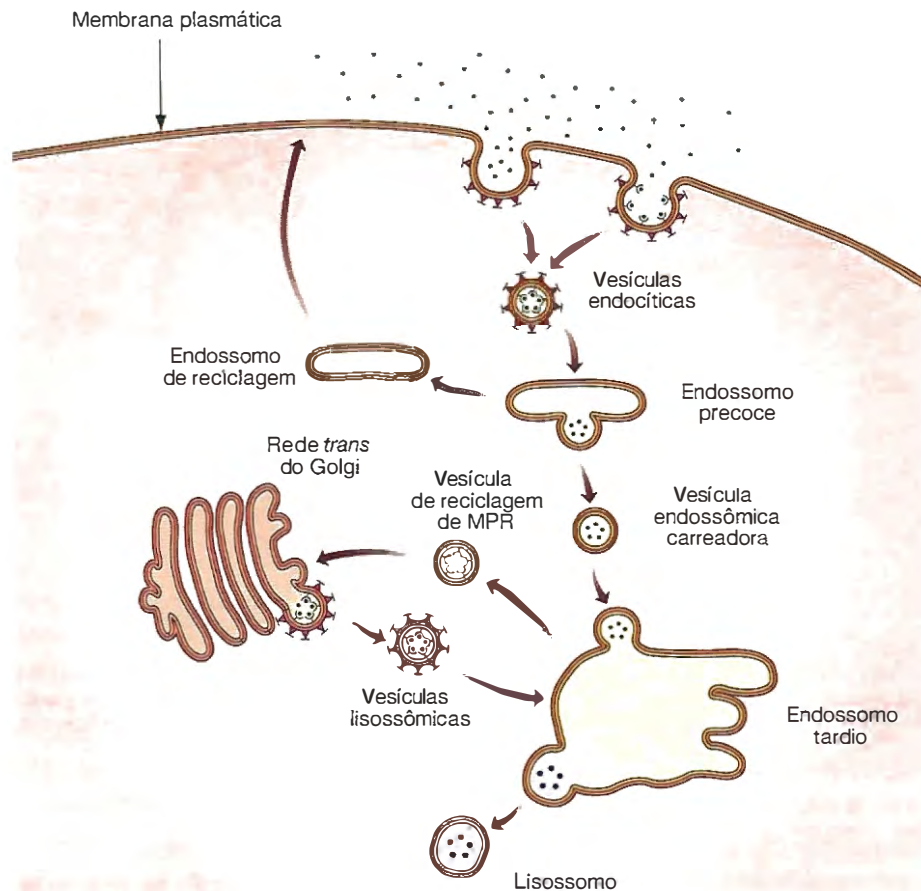



Figura 10.25 ▪ Esquema da via endocítica. A célula captura materiais do meio extracelular por endocitose mediada ou não por receptores. O material é internalizado em vesículas endocíticas, cobertas por AP2 e clatrina, que mergulham no citoplasma e fundem-se com o endossomo precoce. Do endossomo precoce brotam os endossomos de reciclagem, que carregam os receptores de volta para a membrana plasmática, sendo que aqueles que não retornam, brotam como parte da membrana de vesículas que mergulham no lúmen do endossomo precoce e lá são degradados. Esse processo leva à infrarregulação desses receptores. Do endossomo precoce formam-se as vesículas endossômicas carreadoras (ECV) que carregam o material endocitado na direção dos endossomos tardios, com os quais se fundem. Aos endossomos tardios também se fundem as vesículas lisossômicas cobertas por AP1 e clatrina, contendo as enzimas lisossômicas ligadas aos MPR. Com a queda do pH, os MPR desligam-se das enzimas e brotam como parte das membranas de vesículas que retornam para a rede *trans* do Golgi. Esse compartimento contém, então, apenas as enzimas hidrolíticas e o material endocitado que, com o pH 5,0, iniciam a degradação e constituem-se no lisossomo.

(Figura 10.25). O interior dos endossomos tardios é mais ácido (pH 6,0) que aquele encontrado no endossomo precoce e contém, também, maior quantidade de vesículas intraluminais, razão pela qual são frequentemente denominados endossomos multivesiculares. Além disso, as membranas dessas vesículas intraluminais contêm grandes quantidades do lipídio ácido lisobisfosfatídico (LBPA), que é encontrado apenas no interior dos endossomos tardios e dos lisossomos. Essa série de fusões e fissões de vesículas e de compartimentos membranosos que se inicia no endossomo precoce e culmina no endossomo tardio é chamada maturação endossômica.

O endossomo tardio é também o compartimento com o qual se fundem as vesículas que contêm enzimas lisossômicas ligadas aos receptores de manose 6-fosfato (MPR), que brotaram da rede *trans* do Golgi recobertas por AP1 e clatrina. A diminuição do pH faz com que as enzimas se dissociem dos MPR e agora, do endossomo tardio brotam vesículas que reciclam os MPR de volta para a rede *trans* do Golgi. Restam, assim, apenas as enzimas hidrolíticas e o material endocitado que, com o pH em torno de 5,0, constituem o compartimento final da via endocítica, o lisossomo, no qual ocorre a digestão. Uma característica distintiva entre o lisossomo e o endossomo tardio é a total ausência, no lisossomo, de receptores de manose 6-fosfato (MPR). As moléculas resultantes da digestão, tais como aminoácidos, ácidos graxos e carboidratos, saem pelos transportadores presentes na membrana dos lisossomos (mencionados anteriormente) e se difundem para o citosol, onde serão utilizadas na síntese das mais diversas moléculas celulares.

▪ *Via fagocítica e autofágica*

A fagocitose é um processo que possibilita às células de defesa internalizarem organismos invasores, células em apoptose ou mesmo outras células. Quando projeções da membrana envolvem o alvo, vias intracelulares de sinalização são ativadas, levando à reorganização do citoesqueleto de actina e à formação de um vacúolo, o fagossomo, que mergulha no citoplasma da célula (Figura 10.26).

Em seguida, esses fagossomos fundem-se com os lisossomos, formando o fagolisossomo. As bombas de prótons encontradas na membrana quebram o ATP e liberam os prótons para a luz do fagolisossomo, que se torna ácido, alcançando valores de pH entre 4,5 e 5,0, ideal para a atividade das

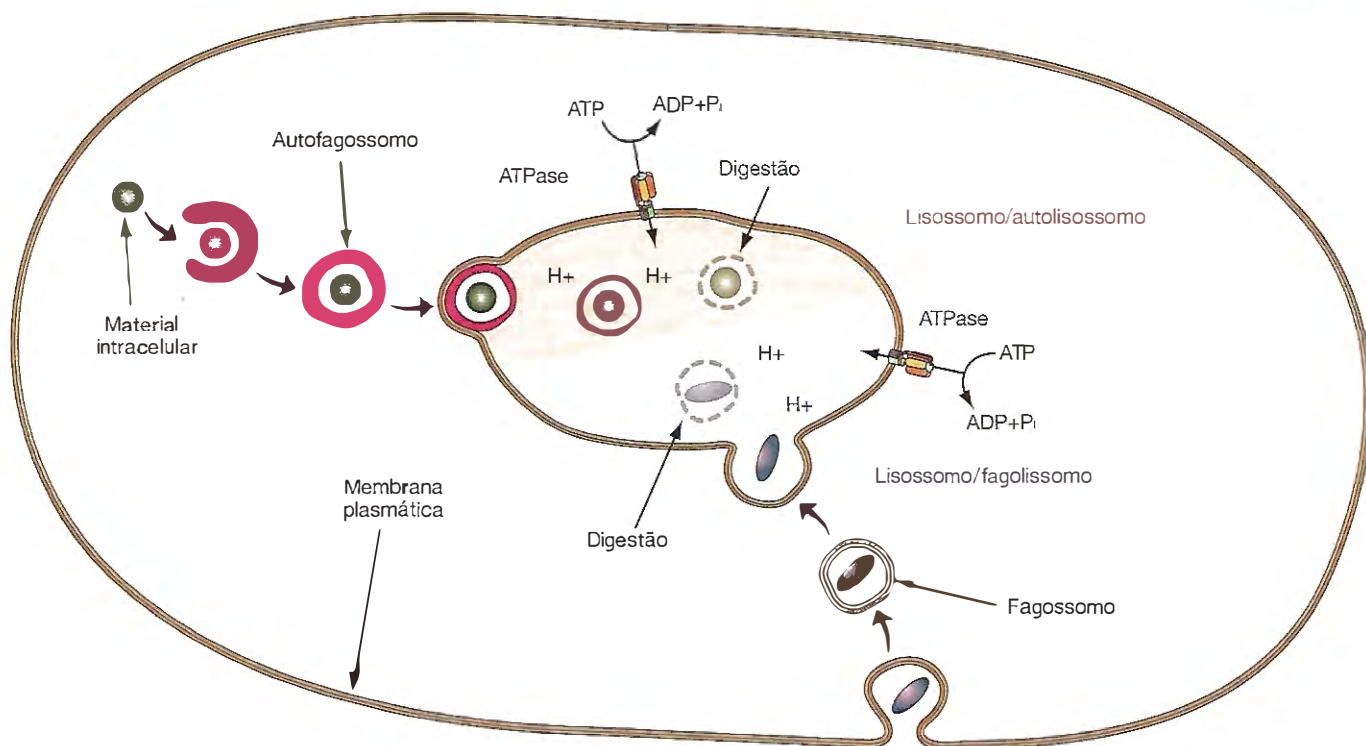



Figura 10.26 ▪ As vias fagocítica e autofágica estão ilustradas neste esquema. Na fagocitose, quando materiais extracelulares com dimensões de 0,5 μm ou mais atingem a membrana plasmática da célula, esta emite prolongamentos que envolvem e englobam o material. Forma-se, então, o fagossomo que mergulha no citoplasma e funde-se com o lisossomo, resultando no fagolisossomo. Complexos ATPase encontrados na membrana do fagolisossomo quebram o ATP e bombeiam prótons para o interior do fagolisossomo, que alcança pH em torno de 5,0, ativando as enzimas lisossômicas, que degradam o material fagocitado. Na autofagia, componentes celulares são envolvidos por uma dupla membrana, que se encurva até formar uma vesícula, o autofagossomo. Quando o autofagossomo funde-se com o lisossomo, sua membrana externa torna-se parte da membrana do autolisossomo, e a vesícula é liberada na luz do autolisossomo. Quando o pH chega a 5,0, ocorre a digestão do material autofagocitado.

hidrolases ácidas. O material a ser digerido mistura-se, assim, com as enzimas hidrolíticas (Figura 10.26).

Algumas vezes permanecem, nos fagolisossomos, restos de material que resistiu ao processo digestivo, formando-se os corpos residuais, que se acumulam, com o decorrer do tempo, nas células de vida longa. Em alguns tipos celulares que não se dividem, como os neurônios e as células do músculo cardíaco, os corpos residuais se agregam, formando partículas grandes, visíveis ao microscópio de luz, contendo lipídios complexos de cor parda e chamadas de grânulos de lipofuscina. Esses grânulos aumentam de número com a idade, e, ao contrário do que se acreditava, eles ainda podem ser requisitados para degradação. Outras vezes, o acúmulo de material nos corpos residuais é consequência de um defeito genético dos lisossomos. Esses casos são resultantes de mutações em um ou mais genes que codificam uma ou mais enzimas lisossômicas, fazendo com que a enzima não se expresse adequadamente. Por exemplo, na doença de Pompe, cujo surgimento se verifica nos primeiros anos de vida, todas as células, sobretudo as hepáticas e musculares, se carregam de grande quantidade de glicogênio. Nessa doença, os lisossomos são deficientes na enzima glicosidase, que degrada o glicogênio. Os acúmulos de glicogênio são mais acentuados no fígado e no músculo, porque nesses tecidos há normalmente maior quantidade desse polissacarídio. Existem diversas outras doenças genéticas em que a falta de determinadas enzimas lisossômicas pode produzir acúmulos de glicosaminoglicanas ou lipídios.

A autofagia, por outro lado, é um mecanismo utilizado pelas células para degradar componentes citoplasmáticos, como organelas que já cumpriram sua vida média ou estruturas a serem degradadas durante os processos de diferenciação e de desenvolvimento embrionário. Esses componentes são envolvidos por uma dupla membrana, formando uma vesícula, o vacúolo autofágico ou autofagossomo (Figuras 10.26 e 10.27).

Os autofagossomos, envolvidos por essa membrana dupla, fundem-se com os lisossomos formando organelas chamadas autolisossomos (Figura 10.26). Durante a fusão, a membrana externa do autofagossomo torna-se parte da membrana do autolisossomo, enquanto a vesícula interna é liberada no interior da organela, onde é degradada pelas enzimas hidrolíticas.

Em determinadas condições fisiológicas, há um aumento da autofagia. Isso acontece, por exemplo, nas glândulas mamárias quando termina a lactação. Durante a gravidez, aumenta o número de células secretoras dessas glândulas, para produzir leite após o parto. Terminado o período de lactação, ocorre a destruição autofágica dos restos de secreção e das organelas não mais necessárias.

As enzimas lisossômicas, algumas vezes, também participam da digestão de moléculas extracelulares. Um aumento nos níveis citosólicos de Ca^{2+} induz a fusão da membrana dos lisossomos com a membrana plasmática, fazendo com que as enzimas sejam exocitadas no meio extracelular. Essa secreção das enzimas lisossômicas ocorre em condições normais, como, por exemplo, na remodelação dos ossos durante o crescimento, quando as enzimas lisossômicas digerem a matriz óssea para possibilitar o crescimento do esqueleto.

Células envolvidas em defesa e resposta imune, tais como os basófilos, eosinófilos mastócitos e linfócitos, apresentam compartimentos lisossômicos especializados, denominados lisossomos secretores. Esses lisossomos realizam a secreção regulada das suas enzimas, ou seja, secretam apenas em resposta a um

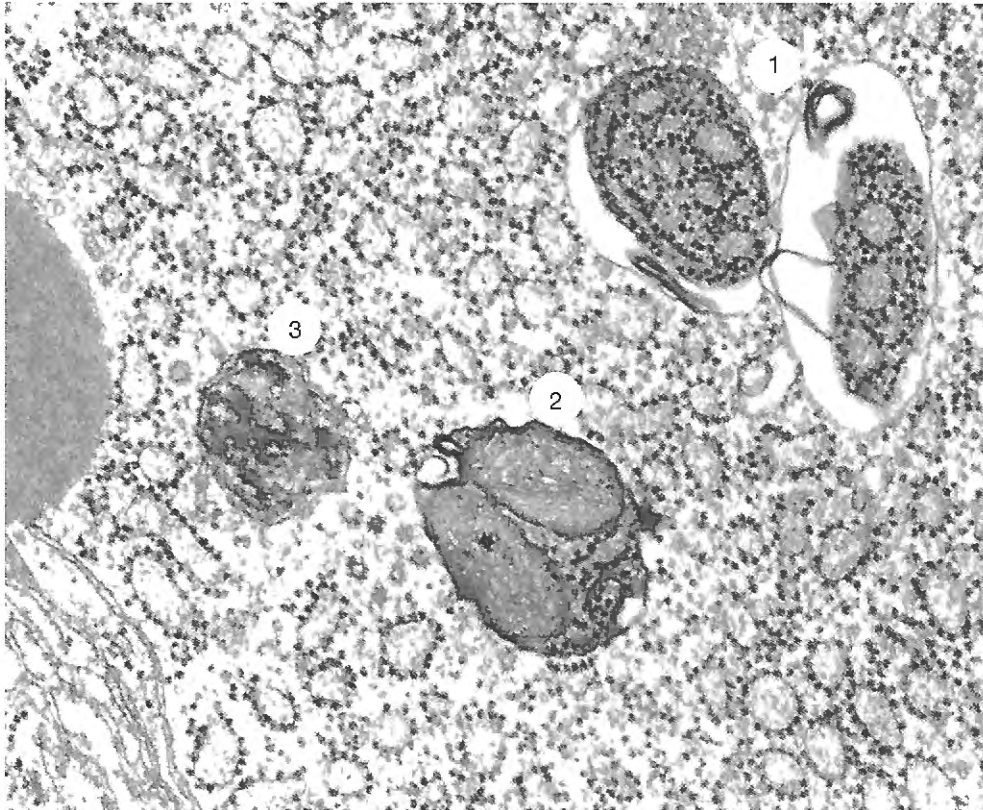



Figura 10.27 ▪ Eletromicrografia de célula acinosa do pâncreas. Aparecem diversos autofagossomos em diferentes etapas de digestão. Observe, em **1**, duas porções de retículo endoplasmático rugoso segregadas do citoplasma por membrana e em início de alteração. Em **2**, aparecem duas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso em fase mais avançada de digestão. O processo está em sua fase final em **3**, na qual já não se reconhecem as organelas. Aumento: 45.000×.

estímulo externo. Eles desempenham duas funções: estocam as enzimas lisossômicas que, no momento apropriado, são secretadas no meio extracelular e inserem na membrana plasmática moléculas envolvidas no processo da resposta imune.

▪ Via ubiquitina-proteossomos

Os níveis intracelulares de proteínas são mantidos tanto pela síntese de novas moléculas quanto pela degradação das moléculas existentes. A vida média das proteínas celulares varia bastante, e a sua degradação constitui um aspecto importante da regulação celular. Muitas das proteínas que são degradadas precocemente são moléculas reguladoras, como os fatores de transcrição. A reciclagem dessas proteínas é necessária para tornar possível que seus níveis se alterem rapidamente em resposta a estímulos extracelulares. As enzimas da glicólise, por exemplo, têm vida muito longa, enquanto as proteínas que iniciam a replicação do DNA têm vida muito curta. Há indicações de que os aminoácidos terminais marquem a duração das proteínas que, após realizarem suas funções, são degradadas.

Os lisossomos são incapazes de distinguir e degradar moléculas proteicas individuais que já tenham cumprido suas funções e se tornado desnecessárias, bem como aquelas que foram sintetizadas com defeito ou sofreram algum tipo de alteração, tornando-se não funcionais. Essa função é desempenhada pela via ubiquitina-proteossomo, que é a principal responsável pela degradação seletiva de proteínas. Nessa via, a degradação das moléculas proteicas é realizada em complexos multienzimáticos denominados proteossomos. Os proteossomos são encontrados tanto no citoplasma quanto no núcleo de todas as células eucariontes. A distribuição intracelular, o número de proteossomos e a proporção relativa entre o núcleo e o citoplasma variam de acordo com o tipo celular, com o estágio de diferenciação, com as condições fisiológicas e do microambiente, entre outros fatores. Geralmente, células com alta capacidade de proliferação têm grande quantidade de proteossomos.

Há dois tipos de proteossomos já caracterizados: o proteossomo 20S e o 26S. O proteossomo 20S tem cerca de 700 kDa de massa, enquanto o 26S tem 2 MDa. Ambos são constituídos por complexos multienzimáticos que se dispõem como um cilindro, contendo uma câmara central com 20S de coeficiente de sedimentação. O proteossomo 26S apresenta, em cada uma das extremidades da câmara, uma estrutura em forma de tampa, com 19S (Figura 10.28). As diferenças entre esses dois tipos de proteossomos estão listadas na Tabela 10.1. Considerando que a atividade do proteossomo 26S é a mais complexa e a melhor esclarecida, abordaremos a seguir seus mecanismos de ação.

A câmara central é constituída por quatro anéis superpostos, 2 α externos e 2 β internos, cada um contendo sete enzimas. Os dois anéis internos contêm as enzimas proteolíticas, ou seja, que degradam proteínas. Cada um deles apresenta três sítios ativos que ficam voltados para o interior da câmara, garantindo, assim, que a atividade catalítica ocorra em um ambiente isolado do citosol. Os complexos 19S reconhecem e controlam a entrada das proteínas a serem degradadas, e ainda desnaturam essas proteínas para torná-las acessíveis aos sítios ativos das enzimas presentes na câmara proteolítica (Figura 10.28).

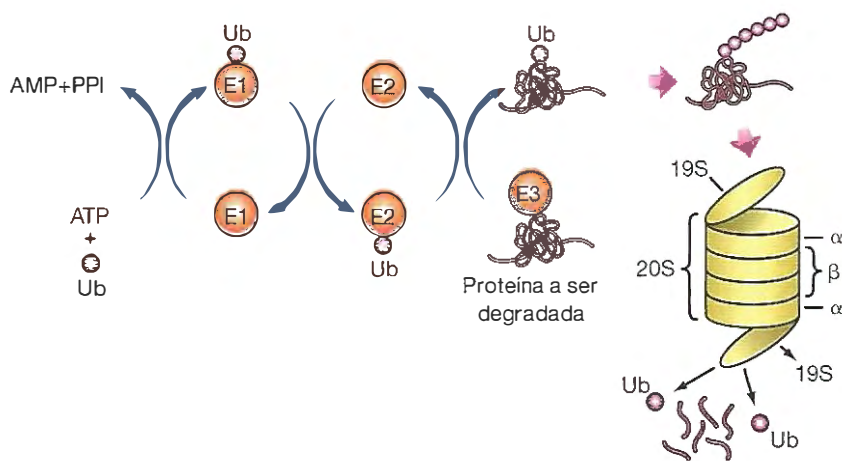



Figura 10.28 ▪ Esquema que ilustra a degradação de proteínas no proteossomo 26S. Inicialmente, a enzima E1, utilizando a energia do ATP, liga-se à ubiquitina e a transfere para a E2, que a transfere para a E3. A E3 liga-se à proteína a ser degradada e, com o auxílio da E2, estabelece a ligação covalente entre a ubiquitina e a proteína. Esse processo repete-se várias vezes, de modo que as proteínas que irão sofrer degradação proteolítica são marcadas por várias moléculas de ubiquitina e, em seguida, interiorizadas nos proteossomos. O proteossomo 26S é um complexo multienzimático cilíndrico, constituído por uma câmara proteolítica com 20S de coeficiente de sedimentação. Essa câmara apresenta complexos multienzimáticos formados por quatro anéis, dois α e dois β. Em cada extremidade do cilindro associam-se, como tampas, estruturas com 19S de coeficiente de sedimentação. No interior do proteossomo, as moléculas de ubiquitina são desligadas das proteínas, que por sua vez são quebradas em peptídios. Os peptídios, bem como as moléculas de ubiquitina, são liberados no citosol.

As proteínas que devem ser digeridas nos proteossomos 26S são marcadas por se ligarem covalentemente a diversas moléculas de uma proteína abundante no citosol, a ubiquitina. A ubiquitina é um polipeptídio com 76 aminoácidos altamente conservado em todos os eucariontes animais, vegetais e mesmo fungos. As proteínas a serem degradadas são marcadas pela ligação da ubiquitina a cada resíduo do aminoácido lisina encontrado na proteína. Desse processo participam várias enzimas que ativam a ubiquitina livre e promovem sua ligação ao aminoácido. Estas enzimas são denominadas E1, E2 e E3 e atuam em sequência. A E1 cliva o ATP, ativando a ubiquitina, e transfere-a para a enzima E2, que, por sua vez, apresenta a ubiquitina para a E3 (Figura 10.28). A E3 liga-se à proteína a ser degradada e interage com a E2 para estabelecer a ligação covalente entre a ubiquitina e a proteína-alvo. Este processo repete-se várias vezes, de modo que diversas moléculas de ubiquitina são ligadas a uma única proteína, formando uma cadeia de poliubiquitinas, que é a marca para a destruição da proteína. O complexo formado pelas ubiquitinas associadas à proteína que vai ser destruída é reconhecido pelo complexo 19S, que contém seis cadeias polipeptídicas com atividade de ATPase, enzima que retira do ATP a energia necessária para a atividade proteolítica. Depois de reconhecer a proteína ubiquitinada, este complexo retira as moléculas de ubiquitina, que são transferidas para o citosol para serem reutilizadas em um novo ciclo. Então, as enzimas do complexo desnaturam a proteína e liberam seu acesso para a câmara proteolítica. Assim, a proteína penetra no complexo 20S, entrando em contato com os sítios ativos das enzimas proteolíticas, onde é clivada em peptídios (Figura 10.28). Esses peptídios são devolvidos ao citosol, no qual são digeridos até aminoácidos por enzimas citosólicas. Os aminoácidos são reaproveitados pela célula para nova síntese proteica ou para outras finalidades.

Tabela 10.1 ▪ Diferenças estruturais e funcionais entre os proteossomos 20S e 26S.

Proteossomo 20S	Proteossomo 26S
Constituído pela câmara central 20S	Formado pela câmara central 20S e duas subunidades 19S, uma em cada extremidade
Degrada proteínas não ubiquitinadas dobradas ou reunidas incorretamente	Degrada proteínas poliubiquitinadas, tais como aquelas reguladoras da expressão gênica, da apoptose e do ciclo celular; regula os níveis enzimáticos da célula
Degradação independente de ATP e de ubiquitina	Degradação dependente de ATP e de ubiquitina
Resistente ao estresse oxidativo	Facilmente inativado em células durante o estresse oxidativo

Os proteossomos desempenham um papel crítico no ciclo de vida da célula. Proteossomos encontrados no núcleo degradam, entre outras, as enzimas envolvidas com os processos de replicação e transcrição do DNA, bem como as enzimas que regulam o ciclo celular (Capítulo 9). A atividade dos proteossomos pode ser regulada pelo estresse oxidativo intracelular (causado pela ação dos radicais livres), uma vez que uma de suas principais funções é degradar proteínas danificadas por radicais livres. Em células cancerosas, que se dividem descontroladamente, a inibição da atividade proteolítica dos proteossomos pode retardar ou mesmo interromper a progressão do câncer, interferindo na degradação ordenada das proteínas que regulam o ciclo celular. Atualmente, vários compostos inibidores da atividade proteolítica dos proteossomos estão sendo testados na terapia dessa doença.

Os proteossomos que já cumpriram seu tempo de atividade são degradados por autofagia.

Integração entre as vias de biossíntese e de degradação

A célula mantém um equilíbrio dinâmico entre a endocitose, a degradação e a síntese de moléculas. Organelas e compartimentos celulares diversos participam de maneira cooperativa desses processos. A associação entre essas vias está ilustrada na Figura 10.29.

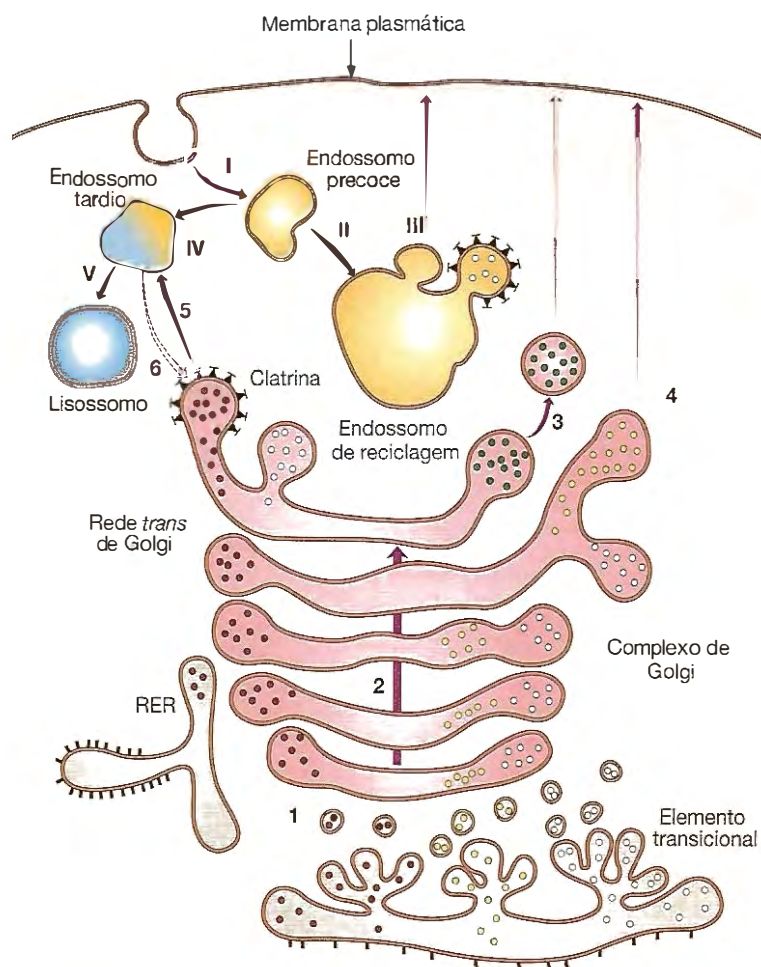



Figura 10.29 ▪ Desenho esquemático que mostra a associação entre as vias endocítica e biossintética. A via biossintética está identificada por algarismos arábicos (1 a 6) e a via endocítica por romanos. Proteínas sintetizadas no RER brotam do elemento transicional do retículo (1) em vesículas que se fundem com a rede *cis*-golgiana. Elas passam pelas várias cisternas do complexo de Golgi (2), onde sofrem modificações adicionais e emergem da rede *trans* do Golgi no interior de vesículas que terão destinos diversos. Vesículas de secreção (3) dirigem-se para a membrana plasmática, assim como moléculas que serão adicionadas à membrana (4). Algumas vesículas recobertas por clatrina contendo hidrolases ácidas se fundem com o endossomo tardio (5), do endossomo tardio brotam vesículas que reciclam os receptores de M6P de volta para a rede *trans* do Golgi (6). Moléculas endocitadas são interiorizadas em vesículas que brotam da membrana plasmática e se fundem com o endossomo precoce (I). Do endossomo precoce forma-se o endossomo de reciclagem (II) que retorna os receptores de volta para a membrana plasmática (III). No processo de maturação endossômica forma-se o endossomo tardio que contém o material endocitado e as hidrolases ácidas (IV) e, finalmente, o lisossomo (V), onde ocorre a degradação do material.

Resumo

As células eucariontes apresentam um complexo sistema de endomembranas, que delimitam compartimentos com funções específicas, as organelas. Desse sistema fazem parte os dois tipos morfológica e funcionalmente distintos de retículo endoplasmático: o retículo rugoso (RER) e o retículo liso (REL). O retículo rugoso contém polirribossomos acolados às suas membranas, enquanto o retículo liso apresenta membranas sem polirribossomos. O REL está envolvido na biossíntese e na modificação molecular dos fosfolipídios de membrana, na síntese do colesterol e seus derivados, bem como na desintoxicação do organismo. O RER participa da síntese e segregação das proteínas que irão compor o complexo de Golgi, lisossomos, membrana plasmática, ou irão ser secretadas. No interior das cisternas do RER, as proteínas adquirem sua configuração tridimensional com o auxílio das proteínas chaperonas. Proteínas destinadas aos peroxissomos, mitocôndrias, plastos e núcleo são sintetizadas por polirribossomos dispersos no citosol.

O complexo de Golgi é constituído por pilhas de sáculos achatados e por vesículas. Cada porção da pilha de cisternas apresenta diferenças estruturais e funcionais. A face da pilha que recebe vesículas do retículo endoplasmático recebe o nome de face proximal ou *cis*. Da face distal ou *trans* brotam as vesículas contendo material que foi processado ao longo das cisternas golgianas. Esse processamento envolve glicosilação, sulfatação ou fosforilação de proteínas e de lipídios. A fosforilação de um resíduo de manose destina enzimas para o interior dos lisossomos. O Golgi também é responsável pela polimerização de açúcares, como aqueles que formam a parede das células vegetais e as glicosaminoglicanas das células animais. As vesículas que brotam da rede *trans* do Golgi são destinadas para secreção, para os lisossomos ou para a membrana plasmática. Todo o transporte intracelular é feito por vesículas que brotam do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Essas vesículas são cobertas por diferentes proteínas e essa cobertura depende do local de brotamento da vesícula e do destino final das proteínas empacotadas em seu interior. As vesículas cobertas atingem seu destino pelo reconhecimento estabelecido entre proteínas de sua membrana e proteínas presentes nas membranas-alvo.

As diferentes maneiras de captação de macromoléculas do meio extra ou intracelular fazem com que elas sigam diferentes vias intracelulares, até alcançarem o compartimento celular onde ocorre a sua degradação. Essas vias são a fagoci-

tica, a autofágica e a endossômica. As vesículas resultantes da internalização das diferentes substâncias são degradadas pelos lisossomos, organelas que contêm enzimas hidrolíticas com atividade ótima em pH ácido. Os lisossomos também podem realizar a secreção de suas enzimas e digerir componentes do meio extracelular.

Os níveis intracelulares de proteínas são mantidos tanto pela síntese quanto pela degradação dessas moléculas. Moléculas não mais necessárias, sintetizadas com defeitos ou alteradas pelo uso, são marcadas para degradação pela proteína ubiquitina, e essa degradação é realizada nos proteossomos, que são complexos citosólicos e nucleares de enzimas proteolíticas.

Bibliografia

Adams, J. The proteosome: structure, function and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.*, 29 (1):3-9, 2003.

Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland, 2002.

Bader, N. *et al.* The proteasome and its role in nuclear protein maintenance. *Exp. Geron.*, **42**:864-870, 2007.

Baumann, O. and Walz, B. Endoplasmic reticulum of animals cells and its organization into structural and functional domains. *Int. Rev. Cell Biol.*, **205**:149, 2001.

Eskelinen, E.L. *et al.* At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.*, **13** (3): 137-145, 2003.

Gu, F.; Crump, C.M. and Thomas, G. Trans-Golgi network sorting. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**:1067-84, 2001.

Lavoie, C. and Paiement, J. Topology of molecular machines of the endoplasmic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data. Histochem Cell Biol., **129**: 117-128, 2008.

Luzio, J. P. *et al.* Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8: 622-632, 2007.

Nelson, D.L. and Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. W.H. Freeman and Company, 2004.

Van Meel, E. and Klumperman, J. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol.*, **129**: 253-266, 2008.

Van Vliet, C. *et al.* Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress Biophys. Mol. Biol.*, 83:1-45, 2003.

Voeltz, G.K.; Rolls, M.M. and Rapoport, T.A. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports*, 3 (10):944-50, 2002.

11

Divisão de Trabalho entre as Células: Diferenciação

Chao Yun Irene Yan

Roteiro

- A diferenciação leva ao surgimento de células especializadas para realizar determinadas funções com grande eficiência
- Há uma relação inversa entre o grau de diferenciação de uma célula e sua capacidade de formar outros tipos celulares (potencialidade)
- O zigoto é a célula que tem potencial máximo (totipotente), podendo formar todas as células do corpo
- A biologia do desenvolvimento estuda os eventos regulatórios da diferenciação celular durante a embriogênese
- Os rearranjos celulares da gastrulação e o início do controle zigótico de transcrição gênica são eventos essenciais para a diferenciação celular durante a embriogênese
- A diferenciação de determinada célula depende, principalmente, da expressão de determinados genes e repressão de outros (controle transcricional)
- O controle transcricional é específico para cada tipo celular e varia do silenciamento total (ausência de transcrição) até sutis diferenças de atividade transcricional
- Os fatores que influenciam na diferenciação podem ser intra ou extracelulares
- A diferenciação celular não se restringe a embriões e é continuada no organismo adulto
- O processo de diferenciação em alguns casos pode ser revertido em um processo conhecido como desprogramação nuclear
- A desprogramação nuclear artificial está no cerne da tecnologia de clonagem de organismos inteiros a partir de células somáticas
- Muitos tecidos contêm células-tronco, que se multiplicam para manter sua própria população e originar células mais diferenciadas (especializadas)
- A medula óssea vermelha, na qual se formam as células do sangue, é um bom modelo para o estudo da diferenciação após o nascimento
- Ao lado da proliferação e diferenciação celulares, há também a apoptose, que é a eliminação das células que não são mais necessárias.

Neste capítulo, será estudada a divisão de trabalho entre as células que constituem o corpo dos seres pluricelulares. Essa distribuição de funções é consequência da diferenciação celular, que consiste basicamente no processo de especialização das células, as quais passam a exercer, com grande eficiência, funções específicas. Até certo ponto, o corpo de um animal pode ser comparado com uma sociedade, na qual os indivíduos, associando-se cooperativa e competitivamente, exercem funções especializadas, como a de, por exemplo, pedreiro, carpinteiro ou pintor. A diferenciação aumenta muito a eficiência do conjunto, mas torna as células dependentes umas das outras. Cada célula especializada exerce com maior eficiência uma função específica. Desse modo, o organismo animal é constituído por diversos tipos celulares que exercem funções específicas. Essa especialização celular é evidente na diversidade de morfologias celulares existentes no organismo adulto e é consequência da expressão gênica seletiva adquirida durante o processo de diferenciação. Em outras palavras, similarmente ao profissional especializado que utiliza instrumentos pertinentes ao seu ofício a célula diferenciada, além dos genes necessários para o metabolismo básico, expressa seletivamente os genes que lhe são necessários para exercer seu papel; por exemplo, o neurônio (célula nervosa) expressa proteínas necessárias para sua função que não estão presentes em um miócito (célula do músculo), e vice-versa.

Os numerosos tipos celulares que constituem um animal adulto derivam de uma única fonte unicelular: o zigoto. Logo após a fecundação, a união da informação genética proveniente dos dois gametas provê ao novo organismo toda a informação genética necessária para a formação dos diferentes tipos celulares que futuramente irão compor o organismo adulto. Portanto, o zigoto é a célula que tem potencial máximo, podendo formar todas as células do corpo. Diz-se, então, que o zigoto é uma célula totipotente.

Diferenciação é o grau de especialização; potencialidade é a capacidade de originar outros tipos celulares

A diferenciação será mais bem compreendida considerando-se que cada célula é dotada de duas características: a diferenciação e a potencialidade. Diferenciação é o grau de especialização da célula, enquanto a potencialidade é a capacidade que a célula tem de originar outros tipos celulares. Em qualquer célula, quanto maior for a potencialidade, menor será a diferenciação, e vice-versa. As primeiras células embrionárias (blastômeros) da maioria das espécies animais podem originar qualquer tipo celular. Essas células têm grau de diferenciação zero e, portanto, apresentam 100% de potencialidade, sendo denominadas totipotentes (toti = total). No outro extremo estão, por exemplo, as células nervosas e as do músculo cardíaco, que perderam até a capacidade de divisão mitótica, não podendo originar sequer outras células iguais. Essas células são extremamente diferenciadas, e sua potencialidade é quase nula. Os exemplos citados são extremos, a maioria das células exibe graus intermediários de diferenciação e potencialidade (Figura 11.1).

É possível, então, definir diferenciação celular como um conjunto de processos que transformam uma célula indiferenciada em uma célula especializada – resultado da atuação de uma série de controles de expressão, que tendem a definir as vias bioquímicas e a morfologia de uma célula, capacitando-a eficazmente para uma determinada função em detrimento de muitas outras. A diminuição da capacidade de exercer outras funções constitui a restrição do potencial celular. Dessa maneira, também se pode definir diferenciação como o processo de restrição do potencial celular.

O caminho que conduz uma célula, desde o estado embrionário até a especialização, consiste em uma sequência de expressões e repressões gênicas controladas. Quais são esses mecanismos e como se integram para originar o organismo são os problemas centrais da biologia do desenvolvimento.

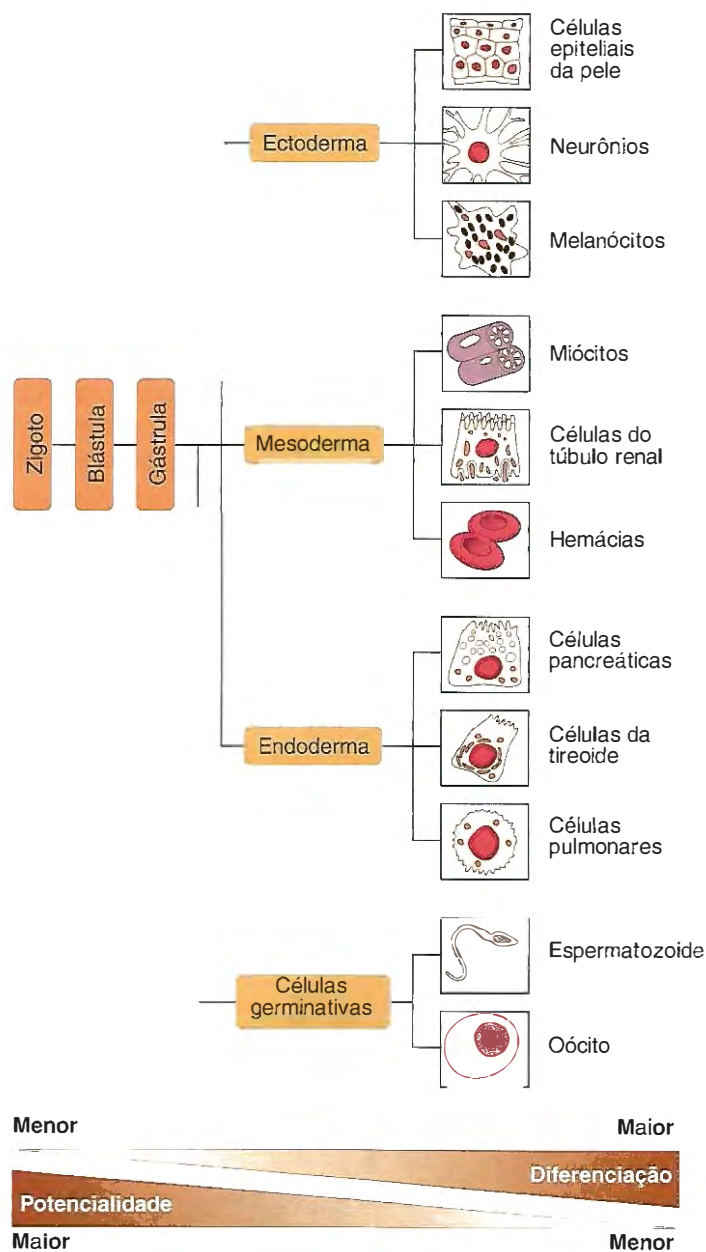



Figura 11.1 ▪ Desenho esquemático que ilustra o processo de diferenciação celular durante a embriogênese. As células do embrião se diferenciam nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), a partir dos quais serão formados todos os tecidos que compõem o corpo. À medida que uma célula se diferencia, sua potencialidade diminui proporcionalmente.

A biologia do desenvolvimento pesquisa a diferenciação na embriogênese

Por motivos práticos, um dos modelos experimentais mais populares no estudo da biologia do desenvolvimento são os anfíbios. As razões para essa escolha são diversas: os anfíbios são vertebrados que, na sua maioria, têm fertilização e desenvolvimento embrionário externos, o que permite a observação dos processos embrionários desde a fertilização até a formação do organismo adulto. Este desenvolvimento externo também facilita manipulações experimentais cujos resultados auxiliam a nossa compreensão dos eventos regulatórios da diferenciação celular durante a embriogênese. Um dos experimentos clássicos realizados neste modelo experimental é o de transplante entre embriões da mesma espécie. Esse experimento determinou o efeito que o microambiente circundante tem sobre a diferenciação de células em estágios diferentes da embriogênese; em outras palavras, acompanhou o processo de diferenciação das células do transplante, em outro contexto tecidual, no embrião aceptor. Os transplantes são retirados de uma região dorsal e inseridos em uma ventral. Quando essa operação é feita em embriões jovens (*i. e.*, menos diferenciados), as células do transplante se desenvolvem de acordo com o tecido aceptor para onde são inseridas; ou seja, formam tecidos ventrais. Contudo, quando o enxerto é feito a partir de embriões doadores mais maduros, as células do transplante formam um tecido diferente da região aceptora circundante (Figura 11.2). O transplante se desenvolve em um tecido dorsal similar ao tecido doador do qual foi retirado originalmente.

Podem-se obter várias conclusões desse experimento. Uma delas é de que a capacidade de responder a sinais externos determinantes da diferenciação depende da idade celular. As células mais jovens apresentam uma plasticidade que as torna suscetíveis aos sinais extracelulares. Desse modo, as células do transplante provenientes de embriões jovens permanecem responsivas aos sinais emitidos pelos tecidos circundantes no embrião aceptor e adotam o programa de diferenciação ditado por estes sinais. Entretanto, passado determinado estágio embriológico, as células que compõem o transplante em embriões tardios, por terem iniciado um programa de diferenciação no embrião doador, continuarão com esta programação independentemente dos sinais externos emitidos pela região ventral circundante no embrião aceptor. Esse experimento demonstra, então, que, com o passar do tempo, existe uma restrição da plasticidade ou potencialidade celular.

Nos animais, a diferenciação celular começa na fase embrionária de gástrula

O primeiro instante em que podemos observar o compromisso das células embrionárias com um programa de diferenciação é durante a gastrulação, a qual ocorre logo após a clivagem.

Imediatamente após a fertilização, o embrião sofre divisões mitóticas sucessivas em grande velocidade no processo conhecido como clivagem (Figuras 11.3 a 11.5). Essas divisões celulares intensas têm como objetivo aumentar rapidamente o número de células que compõem o embrião. Para acelerar este processo, as mitoses são abreviadas por meio da omissão das fases G1 e G2 (fases nas quais ocorre intensa síntese de RNA e proteína, resultando no crescimento da massa celular – Capítulo 9). Durante a clivagem, os processos de transcrição ficam temporariamente inibidos e o embrião se limita a dividir entre as células-filhas as moléculas de RNA previamente acumuladas no citoplasma do óvulo durante a oogênese. Em razão da ausência das fases G1 e G2, o tamanho das células-filhas diminui progressivamente a cada divisão celular. Ao

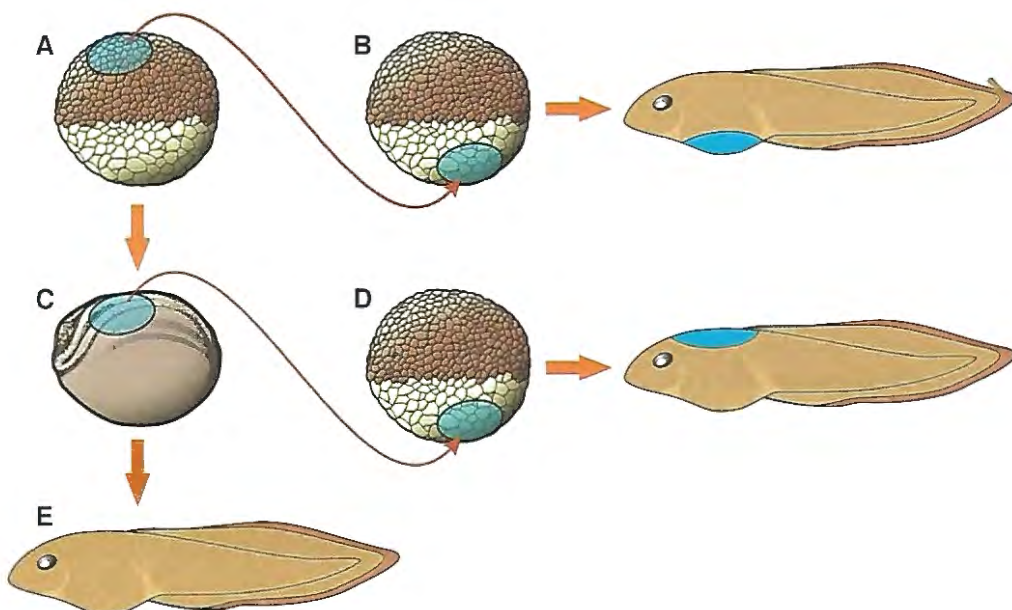



Figura 11.2 ▪ Desenho esquemático que ilustra o transplante entre embriões. A sequência normal de desenvolvimento seria de gástrula (A) para nêurula (C) para girino (E). Quando o transplante é realizado da região dorsal de uma gástrula (A) para a região ventral de outra gástrula (B), o transplante se desenvolve em um tecido ventral no girino aceptor. Quando o transplante é realizado da região dorsal de uma nêurula (C) para uma gástrula (D), o tecido transplantado é mais diferenciado e irá seguir a programação de diferenciação original, formando um tecido dorsal no girino aceptor.

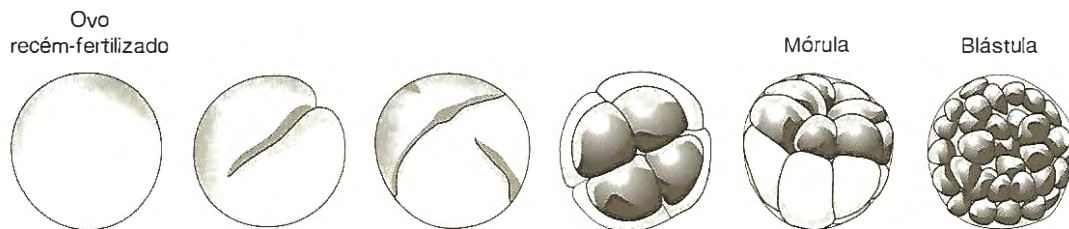



Figura 11.3 ▪ Ilustração do processo de clivagem de embriões de *Xenopus laevis*. O processo de clivagem partilha o conteúdo citoplasmático do zigoto entre as células-filhas. O processo não altera o volume total do embrião.

final da clivagem, o volume total do embrião não é alterado apesar de o número de células ser significativamente maior.

Uma vez acumulado um número suficiente de células, inicia-se a gastrulação (Figura 11.6). As divisões celulares continuam ocorrendo, mas em um ritmo menos acelerado que na clivagem. A gastrulação é o processo de mudança na forma embrionária caracterizada por movimentos celulares intensos (movimentos morfogenéticos), que resulta na definição dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. Neste estágio, o embrião é conhecido como gástrula. É também na gastrulação que as células do embrião iniciam o processo de transcrição, e, consequentemente, ocorre a expressão gênica a partir do genoma zigótico. Como foi mencionado anteriormente, em razão da inibição de transcrição que ocorre na clivagem, os RNA presentes no embrião até a gastrulação derivam exclusivamente do genoma materno e são acumulados no citoplasma durante a maturação do oócito. Na gastrulação, com o início da transcrição a partir do genoma zigótico, tanto o genoma materno quanto o paterno passam a contribuir para o perfil proteico das células embrionárias.

Os rearranjos celulares da gastrulação e o início do controle zigótico de transcrição gênica são eventos essenciais para a diferenciação celular. O rearranjo celular posiciona células nos microambientes que irão definir o programa de diferenciação que cada célula deve seguir. O experimento de transplante entre embriões demonstra que, nas fases iniciais da diferenciação, o microambiente celular é extremamente importante para a definição do tecido.

O processo de rearranjo celular embrionário é conhecido como morfogênese. É um processo que só recentemente tem sido estudado em termos moleculares. Participam dele macromoléculas intracelulares e da matriz extracelular (Capítulo 12). As modificações na forma das células dependem do citoesqueleto, existindo diversas moléculas sinalizadoras extracelulares que estimulam alterações do citoesqueleto. Moléculas da matriz extracelular interagem com receptores da membrana das células, ativando a fosforilação em cadeia de diversas quinases proteicas intracelulares que irão agir sobre o citoesqueleto. É também por interação com macromoléculas da matriz extracelular que as células migram, geralmente em pequenos grupos. Assim, na vida embrionária existe intensa comunicação entre as células, e entre estas e a matriz extracelular, para coordenar a organização do corpo do embrião. O efeito do meio extracelular na diferenciação será abordado mais adiante neste capítulo.

▪ A diferenciação resulta de uma série de expressões gênicas controladas

A deflagração do controle de expressão gênica do genoma embrionário possibilita a produção seletiva das proteínas celulares que serão imprescindíveis para as funções celulares específicas ao fim do processo de diferenciação. Seguindo a analogia inicial da profissionalização de indivíduos da nossa sociedade, seria o equivalente à aquisição gradual e seletiva, por um profissional, das habilidades necessárias para exercer a sua função. As modificações celulares que têm lugar na diferenciação resultam da inativação de determinados genes e da ativação de outros. Por exemplo, um eritroblasto mobiliza a parte de seu patrimônio gênico necessária para a síntese da hemoglobina, porém é incapaz de muitas outras funções metabólicas. Por outro lado, embora um neurônio tenha os genes para a hemoglobina, este não sintetiza hemoglobina, mas, sim, outras proteínas específicas para a sua função.

Todas as células de um organismo têm os mesmos genes. As modificações celulares que ocorrem na diferenciação resultam da inativação de determinados genes e da ativação

Figura 11.4 ▪ Clivagem do zigoto de embriões de mamíferos. O embrião aumenta o número de células sem alterar o volume total. Ao final do processo de clivagem, forma-se o blastocisto, com uma cavidade interna (blastocele) e uma massa celular interna. As células que compõem a massa celular interna irão formar o embrião propriamente dito.

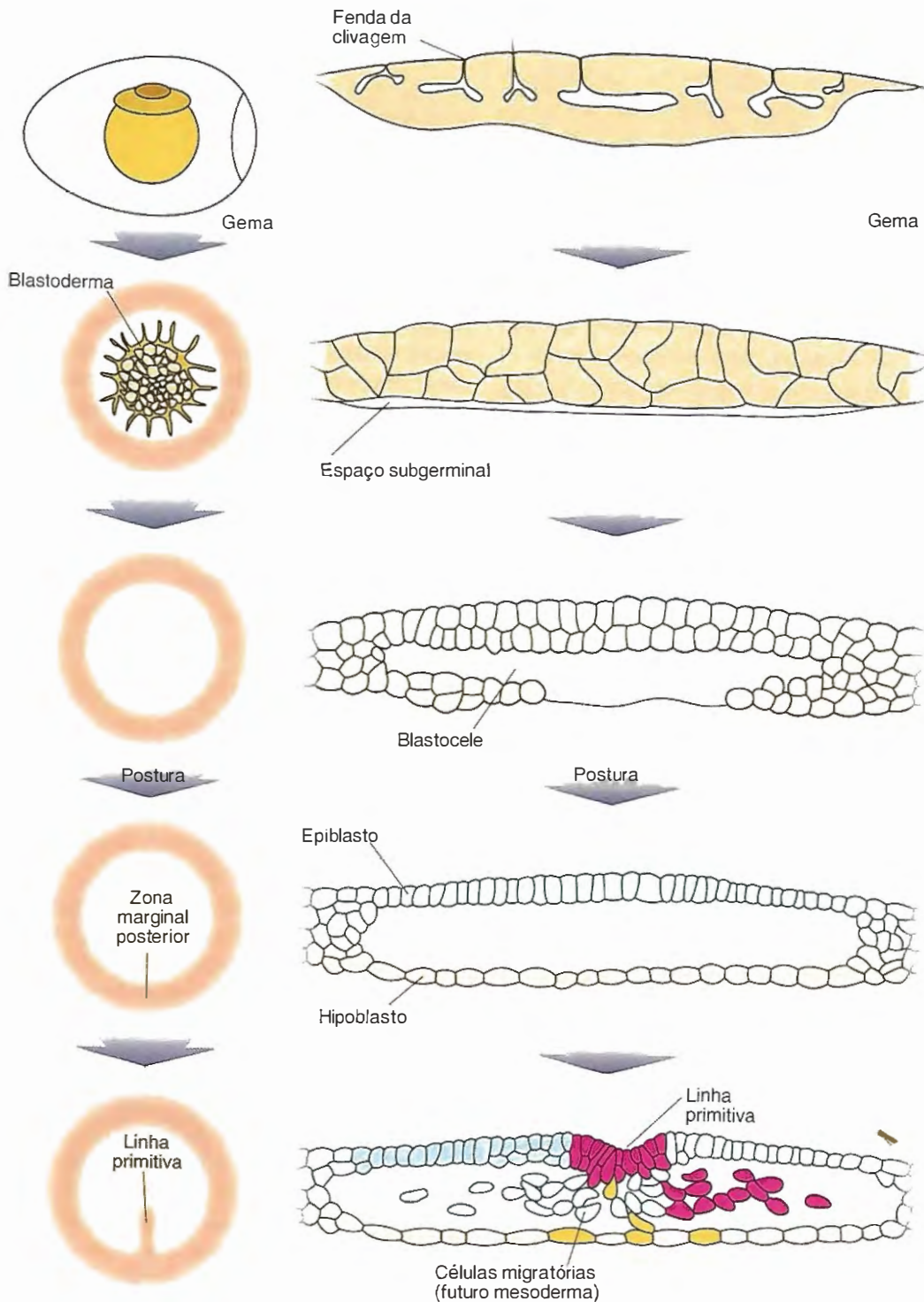



Figura 11.5 ▪ Clivagem no embrião de aves. O processo de clivagem se inicia no oviduto, antes da postura, e forma uma cavidade (blastocele) delimitada por duas camadas de células: o epiblasto e o hipoblasto. Durante a gastrulação as células do epiblasto ingressam para a blastocele pela linha primitiva que começa a se formar da zona marginal posterior.

de outros no genoma. Em outras palavras, em um organismo adulto, cada célula tem codificada em seu DNA a informação necessária para sintetizar todas as proteínas para a formação de um organismo completo, mas apenas uma porção seleta de proteínas é produzida em cada célula. O perfil proteico celular é resultado conjunto de mecanismos que atuam nas várias etapas entre a transcrição e a função proteica; por exemplo, as células nervosas são diferentes das células musculares, por que os genes ativos são diferentes. Essa diferença de atividade gênica resulta na transcrição seletiva de determinados genes, enquanto outros não são transcritos. Assim, os mRNA diferem de uma célula diferenciada para outra.

Em linhas gerais, podemos classificar esses mecanismos em: transcricional e pós-transcricional. O controle transcricional é exercido no DNA, regulando a intensidade de transcrição da maioria dos genes, determinando, portanto, a atividade gênica. Os mecanismos pós-transcricionais agem entre a transcrição do mRNA e a tradução da proteína.

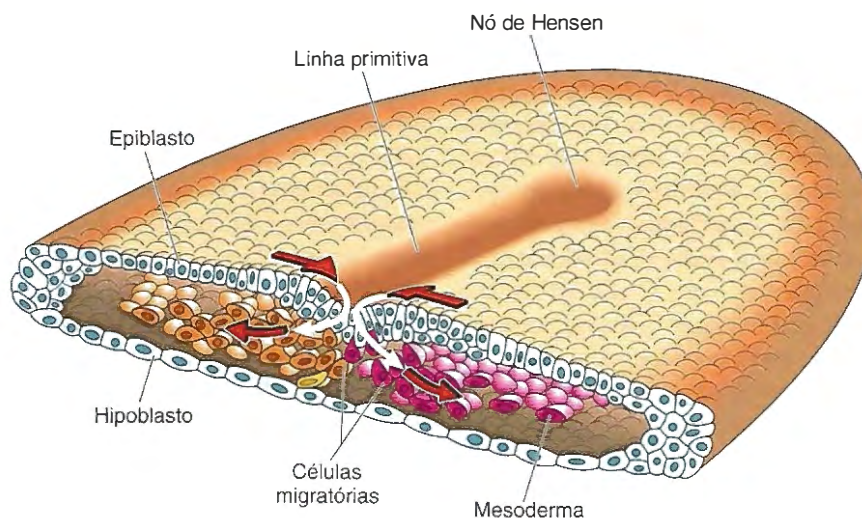



Figura 11.6 ▪ Esquema detalhado da gastrulação no embrião de aves e mamíferos. Liderado pelo nó de Hensen na região anterior, a linha primitiva aumenta de comprimento e torna possível que as células do epiblasto migrem para a blastocele. Ao final da gastrulação, o epiblasto dá origem ao ectoderma; as células que migraram formam o mesoderma e o endoderma.

Durante a diferenciação, há ativação de determinados genes e inativação de outros

O controle transcricional regula a disponibilidade (ativação ou inativação gênica) do DNA para gerar mRNA; é específico para cada tipo celular e varia do silenciamento total (ausência de transcrição) até sutis diferenças de atividade transcricional. A ativação gênica é mediada por proteínas nucleares (conhecidas como proteínas ativadoras de genes ou fatores de transcrição), que reconhecem sequências específicas no DNA (regiões de controle gênico) e favorecem a aproximação das proteínas necessárias para a transcrição propriamente dita, como a RNA polimerase. Os fatores de transcrição importantes para a diferenciação celular são específicos para cada tipo celular; por exemplo, um grupo de fatores de transcrição, denominados fatores determinantes do músculo (FDM), é essencial nas fases iniciais da diferenciação muscular. Essas proteínas são expressas apenas em precursores de miócitos e iniciam a cascata de expressão gênica que caracteriza a progressão da diferenciação muscular. Os FDM são fundamentais para iniciar a transcrição de genes específicos para o músculo. Camundongos cujos FDM foram mutagenizados não apresentam músculo esquelético.

Em contrapartida, a inativação seletiva de genes é igualmente importante durante a diferenciação. Conforme mencionado anteriormente, à medida que a célula se diferencia, perde-se a potencialidade. Esta perda ocorre pela inativação gênica. Há vários níveis de inativação gênica, desde ligação de fatores nucleares inibitórios até modificações ultraestruturais da cromatina regidas por modificações covalentes de nucleotídios. Um exemplo radical de inativação, conhecido como inativação do X, ocorre com o cromossomo sexual em fêmeas de mamíferos. As fêmeas apresentam duas cópias do cromossomo X, enquanto os machos da espécie apresentam um cromossomo X e um Y. Consequentemente, as fêmeas teriam o dobro de genes X em relação aos machos. Para evitar esta discrepância, um dos cromossomos X é randomicamente inativado em cada célula durante a embriogênese da fêmea. A inativação resulta na compactação do cromossomo X de modo que nenhum dos seus genes pode ser transcrito. O cromossomo X inativo e condensado é identificado como o corpúsculo de Barr em preparados histológicos.

Outro fenômeno de inativação gênica, conhecido como impressão gênica, inicia-se com a modificação covalente do DNA genômico por meio da metilação de nucleotídios do tipo citosina de genes seletos. Fatores proteicos nucleares se associam especificamente a estas áreas genômicas metiladas, mediando o silenciamento gênico dessas regiões. Um exemplo dessas proteínas é a histona na sua forma desacetilada. Acredita-se que a combinação de metilação nucleotídica e histonas desacetiladas favorece a formação de heterocromatinas (Capítulo 8). Outrossim, regiões com baixos níveis de metilação – ditas hipometiladas – têm maior probabilidade de serem transcritas. A importância do equilíbrio do padrão de hipermetilação e hipometilação na regulação da atividade gênica pode ser observada em células cancerosas. Muitas delas frequentemente apresentam genoma com padrões de metilação alterados, com genes anormalmente hipermetilados ou hipometilados. Acredita-se que essas aberrações no padrão de metilação genômico são a causa da desregulação gênica que gera, em consequência, as aberrações celulares que originam e sustentam o tumor.

O controle gênico pós-transcricional pode ocorrer de várias maneiras, interferindo na eficiência do processamento do mRNA, o transporte de mRNA para o citoplasma e a tradução do mRNA, variando a vida útil do mRNA ou do produto proteico. Em geral, a regulação pós-transcricional ocorre de maneira mais rápida do que o controle transcricional, respondendo às necessidades celulares imediatas.

Um modo de controle pós-transcricional da expressão gênica é a variação da estabilidade dos mRNA. O RNA mensageiro mais estável, que perdura por mais tempo na célula antes de ser degradado, possibilita a síntese de maior quantidade da proteína por ele codificada e, assim, influi mais poderosamente na atividade celular.

Um claro exemplo da importância deste mecanismo regulatório na função celular ocorre em uma forma de anemia

crônica (talassemia de Constant Spring). A causa dessa anemia está em uma mutação genômica no mRNA da globina, proteína componente da hemoglobina de eritrócitos. Esta mutação resulta no aumento da instabilidade do mRNA de globina. Os pacientes transcrevem o mRNA para globina com a mesma intensidade que indivíduos normais. Entretanto, por terem uma forma instável de mRNA de globina, o nível da proteína globina nos eritrócitos está muito abaixo do normal, resultando na morte prematura deles.

Outro modo de controle pós-transcricional é a regulação do tempo de permanência do produto proteico na célula; ou seja, regulação da estabilidade proteica.

Que fatores controlam os processos de diferenciação celular?

A diferenciação é controlada por fatores intracelulares e extracelulares, requerendo, portanto, intensa comunicação célula-célula e célula-ambiente. Os fatores intracelulares se encontram nas próprias células em diferenciação. A capacidade da célula de responder a estímulos extracelulares ou de iniciar modificações depende das vias de sinalização celulares disponíveis no seu repertório (Capítulo 6). Por exemplo, uma célula que não expressa receptor para insulina na sua membrana seria incapaz de responder à presença dela no meio extracelular. Os fatores intracelulares derivam do programa existente no DNA da célula, ou, no caso do zigoto, de material previamente acumulado no seu citoplasma.

A participação de substâncias acumuladas no citoplasma é bem conhecida, e os exemplos mais evidentes derivam de estudos realizados nos ovos de moluscos, ascídeos e nematoides. No embrião, antes da gastrulação, as células embrionárias dependem das macromoléculas depositadas no seu citoplasma, no organismo materno, durante a oogênese. Estas são distribuídas de modo desigual, com concentração diferenciada de substâncias em locais diferentes. A compartimentalização precoce de componentes citoplasmáticos no zigoto gera uma desigualdade que persiste nas clivagens e é responsável pelo primeiro passo de diferenciação celular. Nas fases iniciais embrionárias, a diferença de conteúdo citoplasmático entre as células é determinante do destino celular das células-filhas.

Por outro lado, os fatores extrínsecos resultam de sinais provenientes de outras células, da matriz extracelular do organismo em diferenciação (fatores locais) ou de agentes provenientes do meio ambiente (fatores ambientais). Os fatores locais resultam da ação de células que agem enviando, por meio de moléculas, sinais que induzem determinados tecidos a se diferenciarem em determinada direção, ou então, esses sinais derivam da matriz extracelular.

O experimento de transplante dorsoventral em embriões jovens, mencionado anteriormente, é um bom exemplo da importância de fatores extrínsecos locais na diferenciação celular. Há muitos outros exemplos desse tipo de interação celular no desenvolvimento dos rins, olhos etc. O interessante é que esses processos de indução se sucedem ao longo da embriogênese, determinando uma sequência ordenada de eventos. É o caso, por exemplo, da embriogênese óptica, na qual a vesícula óptica induz a formação do cristalino, que, por sua vez, induz a formação da córnea. Outro exemplo bem estudado diz respeito à diferenciação do pâncreas e das glândulas salivares. Verificou-se que o broto epitelial que irá gerar esses órgãos só se desenvolve, formando tecido glandular, quando em contato com tecido conjuntivo embrionário. Quando se coloca uma folha de material impermeável entre o broto epitelial e o tecido conjuntivo, não ocorre a diferenciação de células secretoras. Quando, porém, se interpõe entre esses dois tecidos um delgado filtro que permite a passagem de macromoléculas, mas não de células, a diferenciação se processa, deixando bem claro que um mensageiro químico produzido por um tecido agiu no seu "vizinho".

A ação da matriz extracelular sobre a diferenciação é bem exemplificada nos trabalhos que utilizam culturas de tecidos realizadas em frascos previamente recobertos por componentes da matriz, relatados no Capítulo 12, e nos quais se observou nítido efeito de componentes da matriz extracelular sobre o comportamento e a diferenciação das células.

Além da ação de células vizinhas, sabe-se que vários hormônios e fatores de crescimento produzidos em células distantes também afetam a diferenciação e o metabolismo celular. Deve-se ressaltar, também, que uma única célula pode ser ao mesmo tempo receptora e emissora de sinais. Variações no conteúdo proteico ou na expressão gênica de uma célula (fatores intrínsecos) afetam o sinal que ela emite, modificando, portanto, a composição do microambiente celular em que ela está inserida. Desse modo, uma única célula responde e contribui para um conjunto de fatores que interagem, tornando o fenômeno de diferenciação extremamente complexo.

Diversos fatores do meio ambiente podem afetar a diferenciação. Esses fatores são de natureza variada e podem ser físicos (raios X, radioatividade, temperatura), químicos (drogas ilícitas, substâncias poluentes, medicamentos) ou biológicos (infecção viral). São notórios os efeitos deletérios desses agentes, também conhecidos como teratogênicos (*terato*, malformação, e *gênico*, gerador), sobre a diferenciação nos embriões e fetos, causando diversas malformações. Por isso, é preciso evitar que mulheres grávidas sejam expostas às radiações, como os raios X. As substâncias tóxicas oriundas da poluição ambiental ou medicamentos (como a talidomida) também podem produzir malformações. Infecções virais como a rubéola podem causar surdez e cegueira. Os agentes teratogênicos agem, principalmente, nos três primeiros meses da gravidez, uma vez que é durante esse período que os processos de diferenciação ocorrem com maior frequência e intensidade. Eles podem agir sobre os genes, promovendo mutações ou podem inibir a atividade de enzimas que desempenham papel na diferenciação.

A diferenciação celular não se restringe a embriões e continua no organismo adulto

É comum a impressão de que, logo após o nascimento, os órgãos encontram-se completamente diferenciados, e que só lhes resta aumentar de volume. Essa impressão é errônea. No recém-nascido, os vários setores do organismo se encontram em fases diferentes de desenvolvimento e completam a diferenciação em ritmo diferente. Por exemplo, no momento do nascimento, os rins e o fígado não estão completamente diferenciados. O sistema nervoso também se encontra longe de estar completamente desenvolvido no recém-nascido. Tanto é

que a mielinização, importante para o isolamento da "fiação" do sistema nervoso, é lenta, começando no quarto mês de vida intrauterina e prolongando-se até o segundo ano após o nascimento. As conexões entre os neurônios são incompletas ao nascer e completam-se, gradualmente, durante os primeiros anos. Mesmo em adulto, o sistema nervoso continua gerando um número limitado de novos neurônios. Em vertebrados como peixes e anfíbios, a neurogênese no organismo adulto é importante para o crescimento ocular, que continua pela vida toda do animal. A neurogênese em mamíferos adultos é hoje um dos principais enfoques de pesquisa em neurociências. O potencial terapêutico das células-tronco neurais e sua capacidade regenerativa serão discutidos mais adiante.

As glândulas mamárias são um exemplo único de diferenciação, pois estacionam na fase inicial da diferenciação das glândulas exócrinas, isto é, na fase de formação de ductos. Durante a gravidez, em razão do estímulo de diversos hormônios, o processo de diferenciação se reinicia, formando-se os ácinos, que passam a secretar após o parto. Depois da lactação, reverte-se o processo, e a glândula mamária volta a um estado semelhante ao que existia antes da gravidez. Trata-se, pois, de uma glândula cuja diferenciação só se completa na gravidez e é reversível após a lactação.

O processo de diferenciação não é irreversível

Como foi explicado nas seções anteriores, o que ocorre é uma ativação e uma inativação gradual de genes por meio de modificações no DNA genômico. À exceção dos linfócitos, os núcleos de todas as células diferenciadas continuam contendo todos os genes que estavam originalmente presentes no zigoto. A reversão dos processos de restrição genômicos retornaria o núcleo ao estado original zigótico. A restrição da potencialidade pela diferenciação, em alguns casos, pode ser revertida artificialmente ou naturalmente para gerar um núcleo totipotente. Este processo de reversão é conhecido como desprogramação nuclear.

A desprogramação nuclear artificial está no cerne da tecnologia de clonagem de organismos inteiros a partir de células somáticas. O primeiro organismo a ser clonado a partir de uma célula somática foi o anfíbio *Xenopus laevis*. Os pesquisadores retiraram o núcleo de uma célula epitelial de girino e transferiram este núcleo para um ovo enucleado. Elementos citoplasmáticos do ovo desprogramaram o núcleo epitelial, restaurando sua totipotencialidade, gerando um embrião inteiro. A evolução das técnicas de desprogramação nuclear possibilitou a clonagem de mamíferos, a partir de células de animais adultos. A ovelha conhecida como Dolly foi o primeiro animal clonado a partir de uma célula de animal adulto (Figura 11.7). Além da ovelha, outros mamíferos já foram clonados, comprovando definitivamente que células de adultos contêm a informação genética completa para gerar todos os tipos celulares do organismo.

Outro exemplo de desprogramação celular ocorre na regeneração. A capacidade de regeneração do fígado, um órgão constituído por células muito especializadas, é um exemplo muito interessante. A extirpação experimental de dois terços do fígado de um rato adulto, por exemplo, provoca intensa proliferação das células hepáticas restantes, que reconstituem inteiramente a parte extirpada do fígado. Regeneração semelhante também ocorre no fígado humano. Durante a regeneração hepática, ocorre um retorno parcial deste tecido às condições embrionárias. Fatores extrínsecos e intrínsecos característicos da embriogênese hepática são sintetizados. Por exemplo, há um rápido aumento dos níveis de fator de crescimento hepático, que induz enormemente a divisão celular em hepatócitos para que repopulem a porção removida do fígado. Contudo, durante a regeneração, diferentemente da clonagem, os núcleos dos hepatócitos não se tornam totipotentes. A desprogramação dos diferentes tipos celulares hepáticos é parcial, tornando possível apenas a aceleração da divisão celular e a geração de outras células hepáticas.

Alguns tecidos contêm células-tronco ou "*stem cells*" capazes de multiplicação e diferenciação para repor células diferenciadas

Outra possível fonte de reposição e regeneração tecidual no organismo adulto são as células-tronco, também chamadas células-fonte. Em razão do seu potencial terapêutico, a pesquisa sobre células-tronco tem avançado significativamente nestes últimos anos. As células-tronco, para serem classificadas como tal, devem exibir duas propriedades básicas: a capacidade de se dividirem continuadamente, e a capacidade de se diferenciarem em várias linhagens celulares, com suas morfologias e funções especializadas. Em outras palavras, as células-tronco são uma reserva celular constante que pode diferenciar-se em tipos especializados, conforme o tecido considerado. Há duas categorias principais de células-tronco: embrionárias e não embrionárias (também conhecidas como células-tronco adultas).

As células-tronco embrionárias derivam da massa celular interna do blastocisto. Nesta fase do desenvolvimento embrionário, as células da massa celular interna têm o potencial de se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo. Contudo, não são capazes de gerar as células da porção fetal da placenta (trofo-ectoderma), portanto são ditas pluripotentes, e não totipotentes, como os blastômeros.

As células-tronco adultas são raras e estão dispersas nos vários tecidos do organismo; em geral, elas já expressam genes que determinam seus destinos (genes marcadores), conforme os tecidos em que estão localizadas. Por exemplo, as células-tronco da epiderme produzem células que se diferenciam exclusivamente para formar as células epiteliais queratinizadas características do revestimento da pele. Já as células-tronco do epitélio intestinal estão preparadas para originar as células absortivas e caliciformes desse epitélio. Por terem um potencial de diferenciação mais restrito que as células-tronco embrionárias, essas células são classificadas como multipotentes.

A diferenciação das células-tronco recapitula em menor escala, nos tecidos de um organismo adulto, a restrição de potencialidade que ocorre na embriogênese deles. Fatores extrínsecos idênticos ou muito similares aos utilizados pelo embrião durante a sua diferenciação e organogênese têm a mesma importância no controle da divisão e diferenciação das

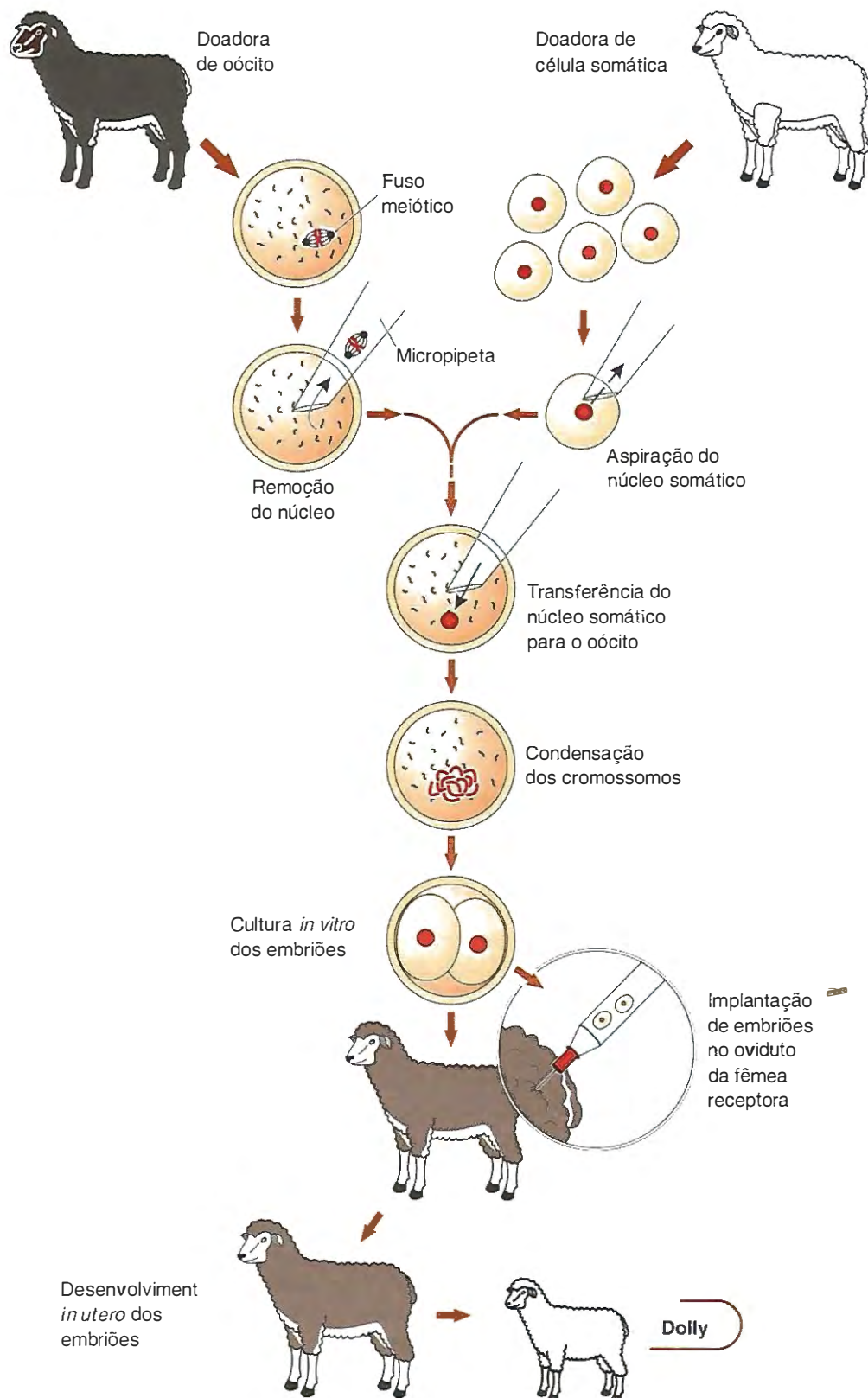



Figura 11.7 • Esquema simplificado do processo de clonagem da ovelha Dolly por transferência nuclear. O processo requereu duas doadoras: uma do oócito e outra de células somáticas. O oócito teve seu núcleo (carga n) removido e substituído pelo núcleo de uma célula somática (carga 2n). O embrião clonado dessa maneira foi cultivado *in vitro* por um curto período e implantado em uma terceira fêmea. A carga genética da Dolly é idêntica à da doadora de células somáticas. Esse experimento demonstra que o núcleo transplantado continha todos os genes que estavam no zigoto.

linhagens de células-tronco embrionárias e adultas. A combinação correta de moléculas de sinalização no meio extracelular, matriz extracelular e interação célula-célula determina o destino de diferenciação das células-tronco *in vivo*. A importância de fatores extracelulares é tal que hipotetiza-se a existência *in vivo* de microambientes especiais ou nichos para a manutenção e diferenciação de células-tronco adultas. Células-tronco adultas que são transplantadas do seu nicho de origem para outro podem se diferenciar em outros tipos celulares que não podiam anteriormente. Este tipo de experimento recapitula o experimento de transplante dorsoventral em embriões jovens mencionado no início deste capítulo. Da mesma maneira que no transplante, a capacidade da linhagem de célula-tronco de responder a sinais externos determinantes da diferenciação depende do seu nível de diferenciação quando foi isolada. Quanto maior o nível de diferenciação da célula-tronco, menor a capacidade de responder a fatores extrínsecos, e menor a sua potencialidade.

Entre os pesquisadores, algumas fontes de células-tronco têm gerado particular interesse em razão do seu potencial terapêutico: o tecido nervoso, a medula óssea e o tecido adiposo. A descoberta de células-tronco no tecido nervoso, outrora considerado um tecido irreversivelmente pós-mitótico no adulto, foi uma surpresa. Atualmente, é reconhecido que existem pequenas populações de células proliferantes em regiões restritas do tecido nervoso. O cultivo e a manipulação *in vitro* dessas células-tronco neurais demonstrou que são capazes de formar neurônios e glia, comprovando a multipotencialidade desta população proliferante. Estas células-tronco também têm uma capacidade limitada de repopular o sistema nervoso quando são reimplantadas experimentalmente.

O estudo das células-tronco da medula óssea vermelha se desenvolveu graças às técnicas que possibilitaram experimentos de hemocitopoese induzida *in vivo* e *in vitro*. Os experimentos *in vivo* foram feitos com a injeção de medula óssea normal em camundongos cujas células hemocitopoéticas tinham sido previamente destruídas por doses muito fortes de raios X. Nessas condições, desenvolveram-se colônias hemocitopoéticas, originárias do doador, no baço dos animais receptores. Uma extensa série de trabalhos *in vitro* demonstrou que essas células-tronco, em meio adequado e quando estimuladas por fatores de crescimento, proliferam e se diferenciam, gerando vários tipos de leucócitos. Da mesma maneira, foi estabelecido que as células-tronco da medula óssea vermelha têm potencialidade para originar, além de todas as células do sangue, diversos outros tipos celulares. Elas têm uma potencialidade semelhante à das células do tecido embrionário chamado mesênquima. Assim, células da medula óssea, além de seu uso já comum no tratamento de determinadas doenças do sangue, começam a ser usadas experimentalmente para produzir células cartilaginosas, ósseas e de outros tecidos, abrindo a possibilidade terapêutica futura de neoformação e reconstituição de tecidos destruídos por doenças hereditárias ou adquiridas.

Por fim, foi demonstrado recentemente que o tecido adiposo é uma boa alternativa para isolamento de células-tronco adultas. As células-tronco deste tecido de animais de laboratório são capazes de formar condrócitos, hepatócitos, cardiomiócitos e células de linhagem neurogênica. Uma das claras vantagens do tecido adiposo como fornecedor de células-tronco é a sua acessibilidade. Em virtude de sua localização anatômica, o procedimento de coleta deste tecido é menos invasivo. Apesar dos resultados promissores obtidos com células-tronco em laboratório, diversas questões precisam ser consideradas antes da incorporação dessas em terapias biomédicas. Primeiro, para a repopulação de tipos celulares específicos, precisamos conhecer os elementos extracelulares e intracelulares que regem a diferenciação celular a partir de uma determinada linhagem de células-tronco. Estudos que abordam a restrição de potencial celular durante a embriogênese têm contribuído significantemente para este item. Deve-se ressaltar que o controle de potencial celular não se restringe apenas aos fatores que promovem expressão de genes da diferenciação, mas também aos que reprimem destinos celulares alternativos. Esta repressão é fundamental para evitar a diferenciação de tipos celulares indesejados a partir da célula-tronco durante a terapia.

Outro elemento importante a ser dominado é a precisão do sítio de aplicação e eficácia na incorporação das células-tronco no tecido-alvo. A incorporação errônea de células-tronco em regiões além da afetada pode acarretar em patologias adicionais, e baixos índices de incorporação diminuem a eficácia do tratamento. Finalmente, a resposta imune a transplante de células-tronco provenientes de doadores também deve ser controlada para evitar rejeição celular.

Enfim, são múltiplas questões a considerar. Todos estes aspectos estão sendo intensamente pesquisados para que a utilização de células-tronco em terapias regenerativas seja uma realidade no futuro.

As células apresentam mecanismos de autodestruição pelo processo de apoptose

Para que a diferenciação leve à morfogênese de órgãos normais, é necessário que, ao lado da proliferação e da diferenciação celulares, exista também a eliminação das células que não são mais necessárias. Mesmo no adulto, a destruição programada de determinadas células também é de grande importância funcional.

O feto humano tem os dedos inicialmente fundidos, em uma espécie de nadadeira, e posteriormente as células localizadas entre os dedos morrem e são eliminadas, ficando a mão com os cinco dedos normais. No timo dos mamíferos adultos, formam-se as células T (linfócitos T), com função defensiva, que atacam células estranhas ao organismo, como bactérias e protozoários invasores, mas se forma, também, grande quantidade de células T que atacam os tecidos do próprio corpo. Essas células são eliminadas antes de saírem do timo, porque causariam grande dano aos tecidos do organismo se fossem lançadas na circulação sanguínea. A diferenciação das glândulas mamárias, já mencionada, também só é possível porque as células que se formam durante a gravidez, e que não são mais necessárias após a fase de aleitamento do recém-nascido, se autodestroem, fazendo a glândula voltar ao estado que apresentava antes da gravidez. Mesmo durante cada ciclo menstrual, há proliferação de tecido da glândula mamária, que é removido antes do ciclo menstrual seguinte. A remoção da cauda dos girinos, à medida

que eles se transformam em rãs ou sapos adultos, é outro exemplo bem conhecido de morte celular programada.

Em todos os casos mencionados, a morte celular acontece pelo processo denominado apoptose (Capítulo 9), caracterizado por uma compactação da célula inteira, incluindo o núcleo, que, junto com o citoplasma, também diminui de volume e, ao microscópio, aparece condensado e escuro. As organelas citoplasmáticas não apresentam grandes modificações iniciais. A cromatina do núcleo condensado (núcleo picnótico) é partida em fragmentos regulares por uma endonuclease que ataca o DNA. Durante a apoptose, as células emitem brotamentos citoplasmáticos, que se destacam da superfície e são rapidamente fagocitados por macrófagos ou por outras células. Na apoptose, a superfície celular se modifica, tornando mais fácil e rápida a fagocitose. Os macrófagos que englobam células em apoptose não sintetizam as moléculas que participam do processo inflamatório. Mesmo que numerosas células entrem em apoptose simultaneamente, como acontece no timo humano, elas não causam inflamação. Ao contrário, as células que morrem por necrose, processo devido a substâncias tóxicas, microrganismos ou outras causas, promovem uma resposta inflamatória nos tecidos adjacentes. As células em necrose mostram-se "inchadas", com aumento de volume da célula inteira e, também, aumento do volume das organelas, bem como das cisternas do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi. As células necróticas se rompem e lançam seu conteúdo no meio extracelular, provocando a inflamação, ao contrário da apoptose, em que a célula se mantém com a membrana plasmática intacta, e os brotamentos destacados do citoplasma, na apoptose, também são delimitados pela membrana celular. Portanto, na apoptose, o conteúdo intracelular não é lançado no meio extracelular.

Os mecanismos moleculares da apoptose estão sendo estudados intensamente por diversos pesquisadores. Sabe-se que a falta de alguns hormônios e fatores de crescimento pode levar as células-alvo à apoptose. Por exemplo, a falta do hormônio masculino testosterona causa apoptose nas células da próstata. Muitas células mantidas em culturas sofrem apoptose quando privadas de determinados fatores de crescimento.

Por outro lado, a apoptose é também um mecanismo de defesa. Células penetradas por vírus, bactérias ou protozoários muitas vezes entram em apoptose, e o mesmo pode acontecer quando o DNA da própria célula passa por mutação. Como o câncer resulta de mutações em células somáticas, a apoptose se constitui em uma defesa natural contra células malignas. Em todos esses exemplos, a morte das células parasitadas ou malignas por apoptose resulta em benefício para o organismo como um todo, pelo extermínio de apenas uma ou algumas poucas células.

Resumo

Neste capítulo, foram estudadas as etapas básicas comuns à diferenciação das diversas células dos organismos pluricelulares. As células embrionárias iniciais geralmente são totipotentes, ou seja, têm a capacidade de se transformar nos vários tipos de células especializadas do corpo. A fixação do destino das células embrionárias é um processo contínuo que se inicia na blástula e envolve etapas sequenciais pelas quais as células embrionárias adquirem a capacidade de seguir diferentes rotas de desenvolvimento.

Durante a diferenciação, há ativação de determinados genes e inativação de outros. Os mecanismos de controle gênico podem ser classificados em transcricionais e pós-transcricionais. Esses eventos são regulados pela ação conjunta de fatores intracelulares e extracelulares, que, por sua vez, são determinados pela comunicação célula-célula e célula-meio ambiente.

A comunicação célula-célula pode ser mediada por mensageiros químicos originados de outras células (hormônios, fatores de crescimento) ou da matriz extracelular do organismo em desenvolvimento. Os fatores de origem ambiental que afetam a diferenciação podem ser de natureza variada, entre os quais podem ser citadas a ação de fármacos (incluindo medicamentos e drogas ilícitas), as radiações ionizantes (raios X, radioatividade, raios UV etc.) e as infecções virais.

A diferenciação celular não se restringe a embriões e continua no organismo adulto. A maturação do tecido nervoso em pós-natos e a diferenciação de células-tronco são exemplos de eventos de diferenciação fora do período de embriogênese. O processo de diferenciação é revertido durante o processo de clonagem e regeneração. Esta reversão requer uma desprogramação nuclear.

Ao lado da proliferação e difereniação celulares, existe também a eliminação das células que não são mais necessárias pelo processo de apoptose.

Bibliografia

Alberts, B. *et al.*: *Biologia Molecular da Célula*, Artmed, 2004.

Bajada, S. Mazakova, I, Richardson J.B. e Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2: 169-183, 2008.

Black, D. *et al.*: Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *Journal of Surgical Research*, **117**:306-315, 2004.

Esteller, M. e Herman, J.G.: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *Journal of Pathology* **196**:1-7, 2002.

Gage, F.: Mammalian neural stem cells. *Science*, **287**:1433-1438, 2000.

Gilbert, S.E.: *Developmental Biology*, 6ª edição, Sinauer, 2000.

Horwitz, E.M. *et al.*: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Medicine*, **5**(3):309, 1999.

Li, E.: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 3:662-673.

McKinsey, T.A.; Zhang, C.L. e Olson, E.N.: Signaling chromatin to make muscle. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**:763-772, 2002.

Reh, T.A., Levine, E.M.: Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *Journal of Neurobiology*, 36:206-20, 1998.

Shi, W., Zakhartchenko, V., Wolf, E.: Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. *Differentiation*, **71**:91-113, 2003.

Waggoner, S.A., Liebhaber, S.A.: Regulation of alpha-globina mRNA stability. *Experimental Biology and Medicine* **228**(4):387-95, 2003.

Wolpert, L.: *Princípios de Biologia do Desenvolvimento*, Artmed, 2000.

12 Biologia da Interação Célula-Matriz Extracelular

Roteiro

- A matriz extracelular influencia a estrutura interna e a atividade das células
- As células interagem constantemente com a matriz extracelular
- A matriz é viscosa e constituída principalmente de colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanas e água
- A fibronectina e a laminina são glicoproteínas com regiões que se prendem simultaneamente às células e a componentes da matriz
- Alterações pós-traducionais e mutações gênicas podem produzir colágenos modificados, responsáveis por doenças
- O processo de degeneração das fibras elásticas, que ocorre com a idade e é o responsável principal pelo surgimento de rugas na pele, é muito intensificado pelo excesso de luz solar.

Os tecidos animais e vegetais não são constituídos apenas por células, mas apresentam um espaço extracelular frequentemente preenchido por um complexo de componentes viscosos e componentes fibrosos: a matriz extracelular, de importância fundamental para as funções dos tecidos. O estudo das interações das células com a matriz extracelular é relativamente recente e tem evoluído muito rapidamente graças ao isolamento das macromoléculas da matriz, à sua localização por métodos imuno-histoquímicos e à caracterização dos receptores celulares para componentes da matriz, técnicas essas frequentemente associadas à cultura de células. Os primeiros dados experimentais que permitiram caracterizar melhor essa interação foram obtidos fazendo-se culturas de células em frascos previamente revestidos com componentes da matriz. Isso foi realizado inicialmente com colágeno e, posteriormente, com outros componentes isolados (fibronectinas, laminina, proteoglicanas), ou com várias combinações dessas macromoléculas. Verificou-se então que, de modo geral, as células crescem mais vigorosamente e assumem aspectos diferentes quando na presença de determinados componentes da matriz. Além disso, elas alteram o seu comportamento quanto à motilidade, à adesividade aos frascos etc., modificando até a disposição intracelular dos componentes do seu citoesqueleto, conforme as macromoléculas da matriz que forram os frascos de cultura. Verificou-se, também, que os componentes da matriz potenciam os seus efeitos, existindo hoje, no comércio, misturas de elementos da matriz que tornam possível cultivar tipos celulares que não cresciam *in vitro*. A constatação de que as células cultivadas em presença de matriz mantêm mais facilmente as características fisiológicas e bioquímicas especializadas presentes *in vivo* nos órgãos de origem foi muito importante. A ausência de componentes da matriz extracelular no meio de cultivo acarreta uma desdiferenciação das células, que tendem a voltar para um estado funcional não especializado.

A matriz extracelular é constituída por um complexo, em proporções variáveis, de inúmeras proteínas e polissacarídios que se organizam formando uma rede, em parte responsável pela grande diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos. A quantidade de matriz depende do tipo de tecido, sendo abundante principalmente nos tecidos conjuntivos, como cartilagem (Figura 12.1), tecido ósseo e derme (pele), e escassa no tecido nervoso e no epitelial. A matriz forma um substrato que fornece condições adequadas para o crescimento e a diferenciação das células dos vários tecidos.

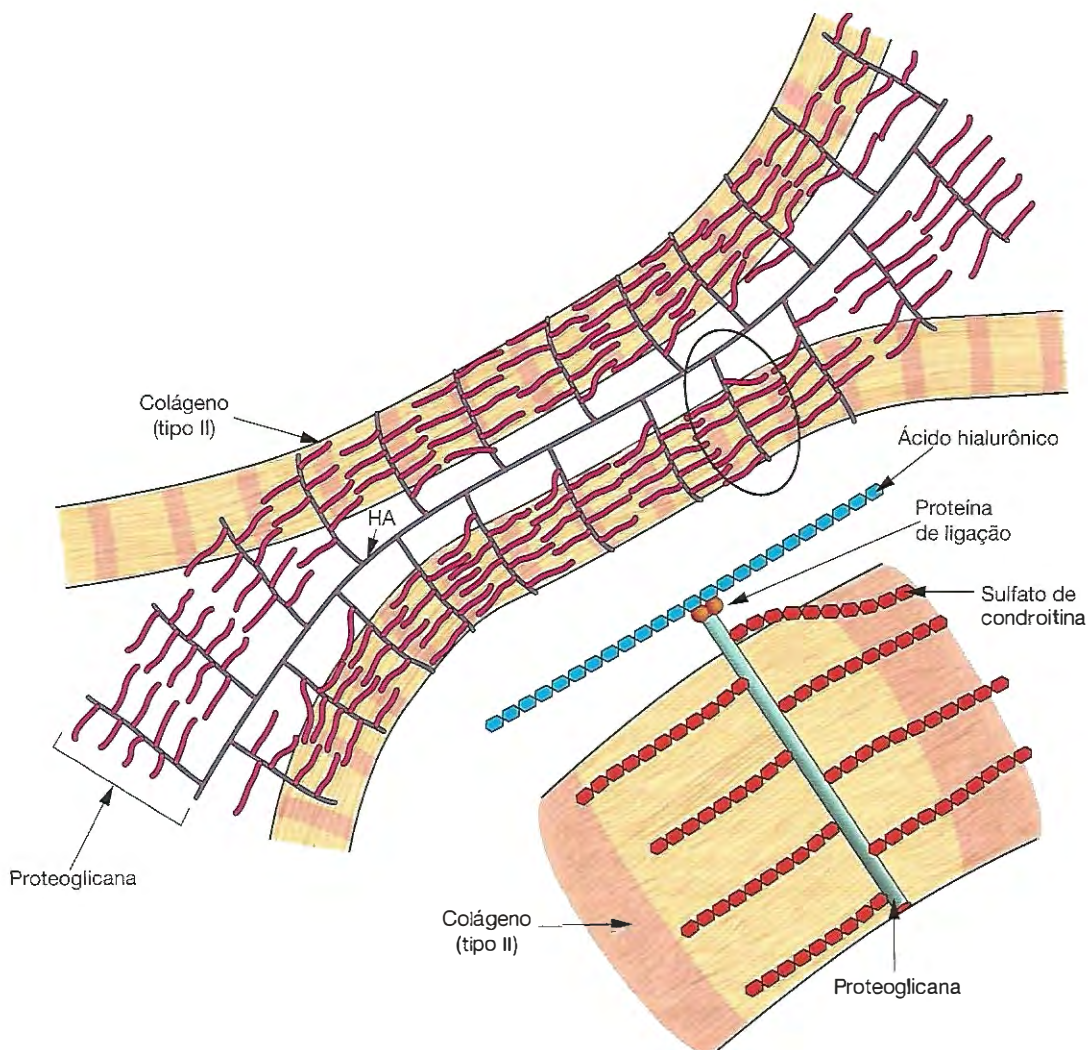



Figura 12.1 ▪ Representação esquemática da organização molecular da matriz da cartilagem hialina. As proteínas de ligação unem a proteína central das proteoglicanas às moléculas do ácido hialurônico (HA) por covalência. Os grupamentos sulfato de condroitina da proteoglicana estabelecem ligações eletrostáticas com as fibrilas colágenas, contribuindo para a rigidez da matriz. O destaque é uma ampliação da área delimitada, para mostrar melhor as interações dos diversos tipos de moléculas encontradas na matriz extracelular da cartilagem hialina.

Os tecidos vegetais também apresentam matriz extracelular, que será estudada no Capítulo 13.

Variações na qualidade e na quantidade das células e da matriz, assim como o modo pelo qual se organizam, são responsáveis pela diversidade dos tecidos, como demonstram os exemplos a seguir enumerados. A deposição de cristais de fosfato de cálcio explica por que determinados tecidos são duros, como nos ossos e dentes, ao passo que outros apresentam um aspecto gelatinoso, ou são rígidos, mas cedem às pressões, como as cartilagens. Há ainda tecidos como os tendões, nos quais fibras de colágeno da matriz extracelular se dispõem como cordas altamente resistentes às tensões.

Na interface do tecido epitelial com o tecido conjuntivo, em torno das células musculares, dos capilares sanguíneos e dos capilares linfáticos, a matriz extracelular forma uma delgada camada, a lâmina basal, que é uma treliça de macromoléculas, importante para a função das células.

Figura 12.2 ▪ Ilustração da estrutura molecular das proteoglicanas (**A**) e glicoproteínas (**B**). As proteoglicanas são constituídas por cadeias retas de dímeros de glicosamina e ácido urônico (glicosaminoglicanas), que se inserem em uma proteína alongada, assumindo o aspecto de "escova de mamadeira", em que o arame central é a proteína e as cerdas são as glicosaminoglicanas. Por sua vez, as glicoproteínas apresentam-se constituídas por uma proteína globular à qual se associa cadeia ramificada constituída por monossacarídios.

A matriz é constituída basicamente por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) embebidas em um gel hidrofílico de polissacarídios associados ou não a proteínas

Os múltiplos componentes da matriz são secretados, principalmente, por células do tecido conjuntivo e dividem-se em dois tipos:

- aqueles constituídos por moléculas proteicas alongadas, que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas, como o colágeno (Figura 12.1) e a elastina
- os constituintes que se agregam, mas não formam fibrilas ou fibras, e que, por sua vez, podem ter dois subtipos:
  - glicoproteínas (Figura 12.2) alongadas, como fibronectina e laminina, cuja função principal é realizar a adesão entre a matriz e as células
  - glicosaminoglicanas e proteoglicanas (Figura 12.2), que formam um gel hidratado no qual estão imersos os outros componentes da matriz.

O colágeno e a elastina são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico de vários tecidos. A fibronectina é responsável pela adesão das células não epiteliais à matriz, e a laminina, por sua vez, é responsável pela adesão das células epiteliais à lâmina basal. Já as glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um gel hidrófilo, semifluido, que permite a circulação de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos nos tecidos conjuntivos. Nas cartilagens, as moléculas de glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um complexo de pontes moleculares unindo as fibrilas de colágeno entre si (Figura 12.1), emprestando a esse tecido a sua importante característica de rigidez e discreta compressibilidade.

Glicosaminoglicanas e proteoglicanas constituem famílias de compostos altamente hidrofílicos, com múltiplas funções

Glicosaminoglicanas são polímeros lineares (não ramificados) de dissacarídios, um dos quais tem sempre um radical amino, sendo o outro um ácido urônico. Constituem uma família complexa da qual o ácido hialurônico, o sulfato de dermatana, o sulfato de condroitina e o sulfato de heparana são os principais componentes. Apresentam radicais carboxila (do ácido urônico) e, com exceção do ácido hialurônico, também radicais sulfato. Consequentemente, são moléculas com carga negativa elevada. Essa situação atrai uma nuvem de cátions (principalmente sódio) que é osmoticamente ativa, atraindo água, o que explica a alta hidrofilia desses compostos e a formação de um gel na matriz extracelular.

Admite-se que esse gel seja importante nos processos de desenvolvimento embrionário, regeneração dos tecidos, cicatrização e interação com o colágeno. Sabe-se, por exemplo, que os grupamentos ácidos desses compostos interagem com os radicais básicos do colágeno, contribuindo para a firmeza (turgor) da matriz extracelular (Figura 12.1).

> A matriz extracelular também é importante em patologia, pois a sua viscosidade retarda a penetração de microrganismo nos tecidos. Bactérias que produzem enzimas capazes de digerir macromoléculas da matriz extracelular se infiltram com mais facilidade nos tecidos. É o caso dos estafilococos, que secretam hialuronidase, e o do clostrídio (responsável pela gangrena), que secreta colagenase.

À exceção do ácido hialurônico, as outras glicosaminoglicanas citadas se prendem por covalência a cadeias proteicas, formando as proteoglicanas (Figura 12.2).

Fibronectina e laminina são glicoproteínas alongadas, multiadesivas e extracelulares que têm em suas moléculas regiões que as prendem a células e a componentes da matriz

Chama-se fibronectina uma família de glicoproteínas que contêm locais de adesão às células, outras moléculas de fibronectina e componentes fibrosos da matriz (Figura 12.3). Servem, assim, de pontes entre as células e a matriz extracelular. Derivam de um único gene cujo RNA pré-mensageiro é processado de maneiras distintas, gerando mais de 20 mRNA diferentes. A fibronectina não somente é responsável pela ligação célula-matriz extracelular, mas também importante no desenvolvimento embrionário. Por exemplo, durante a gastrulação de anfíbios, a fibronectina orienta a migração das células que irão originar o mesoderma.

A laminina é uma molécula constituída por três polipeptídios, em forma de cruz, que também apresenta porções que se ligam ao colágeno tipo IV, ao sulfato de heparana e a receptores celulares de laminina, formando assim pontes que ligam as células à matriz (Figura 12.4). Como o colágeno IV e o sulfato de heparana são os principais componentes das lâminas basais (ver adiante), a laminina serve de ponte de ligação entre as células e essas lâminas.

Figura 12.4 ▪ Desenho esquemático da molécula de laminina, em forma de cruz, constituída por três polipeptídios presos entre si por grupamentos S-S (não mostrados). Estão indicadas as regiões da molécula de laminina que aderem às células e às macromoléculas de matriz extracelular.

As integrinas constituem um complexo de receptores celulares que prendem as células à matriz

As células apresentam uma família de receptores, localizados nas membranas plasmáticas, que se ligam a vários componentes da matriz, entre os quais estão o colágeno e a laminina. Cada um desses receptores é constituído por duas moléculas de glicoproteínas alongadas que receberam o nome genérico de integrinas. As integrinas são proteínas transmembrana, com uma extremidade externa que se prende a componentes da matriz e uma extremidade citoplasmática que se liga, por intermédio da proteína talina, à porção do citoesqueleto constituída de actina (Figura 12.5). Assim se estabelece a comunicação da matriz extracelular com o citoplasma através da membana plasmática, explicando a ação que a matriz exerce sobre o citoesqueleto (Figuras 12.6 e 12.7).

Figura 12.3 ▪ Esquema que ilustra a estrutura da molécula de fibronectina dimérica, constituída por duas cadeias polipeptídicas unidas por grupamentos S-S. Cada cadeia apresenta-se constituída por porções enoveladas (representadas como retângulos) e por segmentos polipeptídicos flexíveis, que alternam com as porções enoveladas. Cada porção enovelada é especializada na adesão a determinadas macromoléculas, localizadas na superfície das células ou na matriz extracelular. (Reproduzida, com autorização, de Junqueira LC, Carneiro J: Histologia Básica, 10ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.).

Há integrinas também nas plaquetas sanguíneas, que são corpúsculos circulantes muito importantes na hemostasia, processo que visa impedir a hemorragia (saída de sangue dos vasos). A hemostasia depende da contração da parede vascular e da coagulação localizada do sangue. Dentro do vaso sanguíneo lesionado, as plaquetas liberam moléculas que promovem a coagulação intravascular. Muitas vezes, as plaquetas saem dos vasos pela ruptura da parede vascular. Quando isso acontece, elas se ligam à fibronectina da matriz extracelular e ao fibrinogênio (proteína do plasma sanguíneo) por meio das integrinas de suas membranas.

Em razão dessa associação entre plaquetas, fibrinogênio e fibronectina, os coágulos se prendem à matriz, processo importante no controle das hemorragias.

Em humanos, já foi observada a ausência de determinadas integrinas, em razão da mutação genética, o que gera determinadas doenças. Por exemplo, na doença de Glanzmann, a ausência do receptor celular para o fibrinogênio causa hemorragias frequentes. A doença chamada de **deficiência do fator de adesão de leucócitos** é provocada pela ausência de uma das cadeias polipeptídicas da integrina dos leucócitos, levando a repetidas infecções bacterianas. O defeito nas integrinas dos leucócitos dificulta a aderência temporária dessas células defensivas à parede vascular, impedindo sua capacidade de migrar por diapedese para os locais de infecção e fagocitar os microrganismos invasores.

Região de ligação à fibronectina

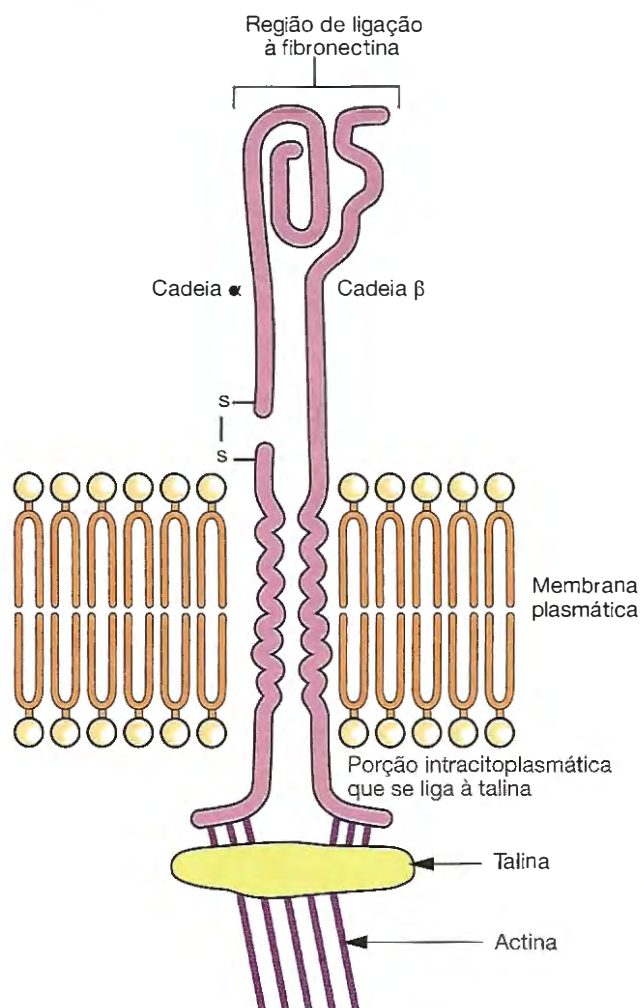
Cadeia α

Cadeia β

S

S

Membrana plasmática

Porção intracitoplasmática que se liga à talina

Talina

Actina

Figura 12.5 ▪ Desenho esquemático do receptor de fibronectina (uma integrina), mostrando que se trata de uma proteína transmembrana que se prende à fibronectina na região extracelular e, no citoplasma, por intermédio da talina, prende-se à actina. A mutação genética que leva à ausência da cadeia polipeptídica β é responsável pela deficiência do fator de adesão dos leucócitos, levando a infecções recorrentes nos pacientes que apresentam esse defeito genético. A suscetibilidade a infecções é consequência da incapacidade dos leucócitos, células de defesa, de se locomoverem, pois seus movimentos dependem de ligações temporárias com macromoléculas do endotélio e da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

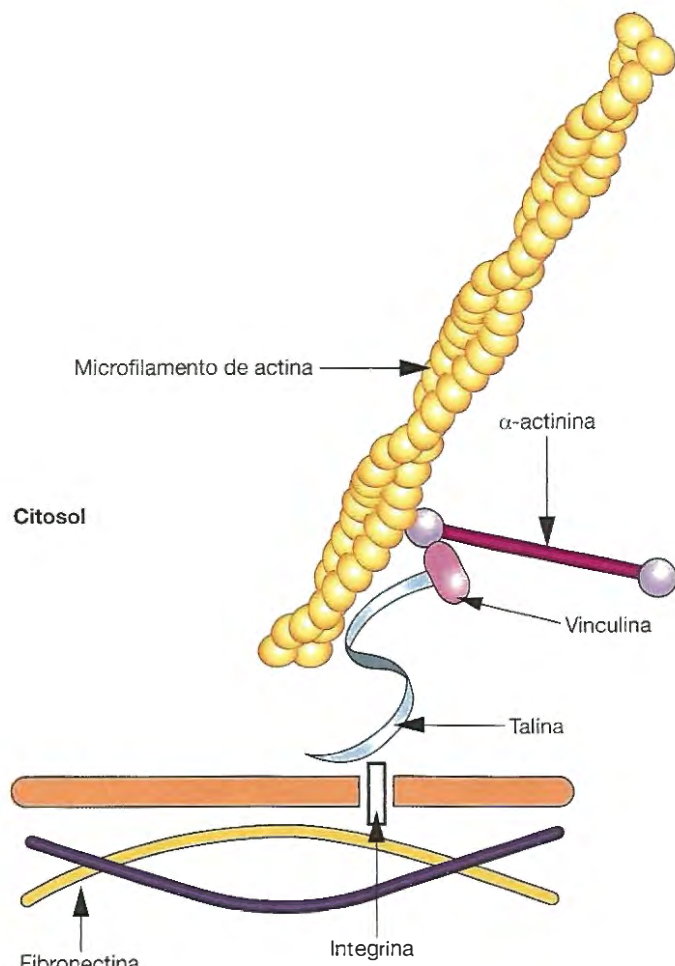
Microfilamento de actina

α-actinina

Citosol

Vinculina

Talina

Fibronectina

Integrina

Matriz extracelular

Figura 12.7 ▪ Este desenho é uma ampliação de uma parte da Figura 12.6, para mostrar os componentes do fibronexo. O filamento de actina prende-se às proteínas vinculina e talina. A talina liga-se a uma integrina da membrana celular, que se prende à fibronectina da matriz extracelular. A molécula de α-actinina prende os filamentos de actina uns aos outros, criando um edifício molecular mais firme.

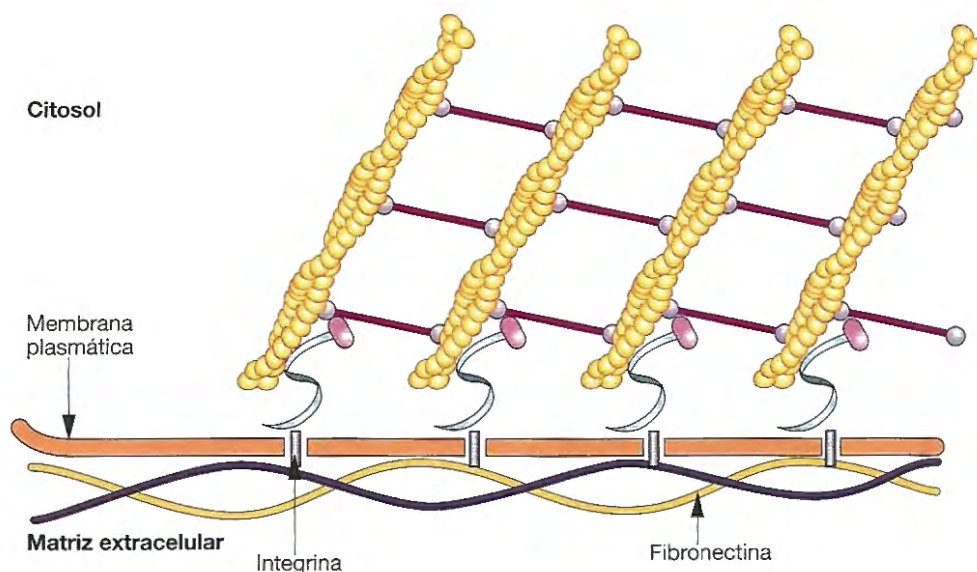



Figura 12.6 ▪ Desenho esquemático mostrando a inserção de filamentos do citoesqueleto em receptores da membrana que, por sua vez, interagem com as células adjacentes (não mostradas no desenho) e com macromoléculas da matriz extracelular. Assim, há uma continuidade entre moléculas intracelulares e moléculas extracelulares, formando fibronexos. Observe que pontes (α-actinina) entre fibrilas de actina adjacentes criam um conjunto de moléculas de actina em contato com área apreciável da membrana plasmática, gerando forças suficientes para promover a adesão das células entre si ou com a matriz extracelular.

A lâmina basal tem papel relevante na biologia e na patologia dos tecidos

A lâmina basal (Figuras 12.8, 12.9 e 12.10) é uma treliça de moléculas de colágeno tipo IV embebida em diversas proteínas, das quais as mais importantes são a laminina e a proteoglicana do sulfato de dermatana.

As moléculas de colágeno nas lâminas basais não se dispõem paralelamente em fibrilas, associando-se, porém, com o aspecto de uma tela de galinheiro, apresentando laminina e proteoglicanas entre suas malhas. Essa estrutura forma, pois, uma malha filtrante de carga aniônica, em virtude do sulfato de dermatana que contém. Serve, portanto, de filtro aniônico, característica importante para a filtração do plasma sanguíneo e formação da urina nos rins. No pulmão, a lâmina basal protege esse órgão contra a penetração de material transportado pelo ar inspirado nos tecidos. Os componentes da lâmina basal são produzidos pelas células epiteliais, endoteliais e musculares, e não por células do tecido conjuntivo.

Para se propagarem no organismo, as células dos tumores malignos de origem epitelial devem atravessar as lâminas basais dos epitélios e as lâminas basais dos capilares, para entrarem na corrente sanguínea ou linfática. Atravessam novamente a lâmina basal, para saírem em direção oposta e formar colônias de células malignas ou metástases (do grego *meta*, longe, e *stasis*, parada) nos vários órgãos.

Os mecanismos pelos quais células de defesa, como os leucócitos, aderem ao endotélio, atravessam os capilares e se movimentam nos tecidos são de grande importância para a compreensão dos processos inflamatórios. Esses movimentos dependem, principalmente, dos receptores que possibilitam o reconhecimento entre as células e da presença de substâncias químicas que atraem as células para a proximidade dos agentes agressores, fenômeno denominado de quimiotactismo.

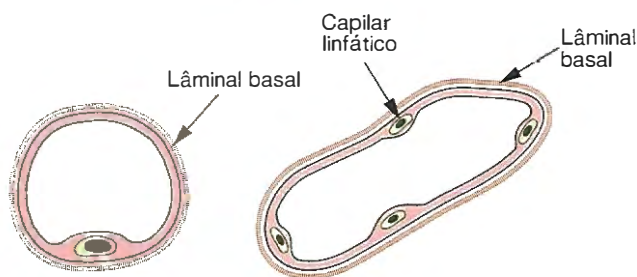
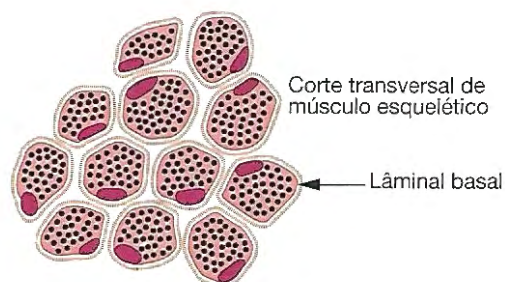
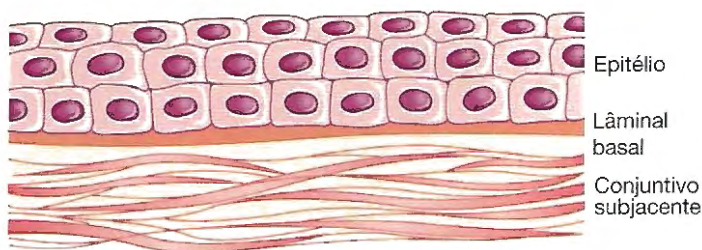



Figura 12.8 ▪ Desenho esquemático que ilustra a presença de lâmina basal separando os epitélios do tecido conjuntivo subjacente. As células musculares e os capilares sanguíneos e linfáticos também são separados do tecido conjuntivo por intermédio de lâminas basais.

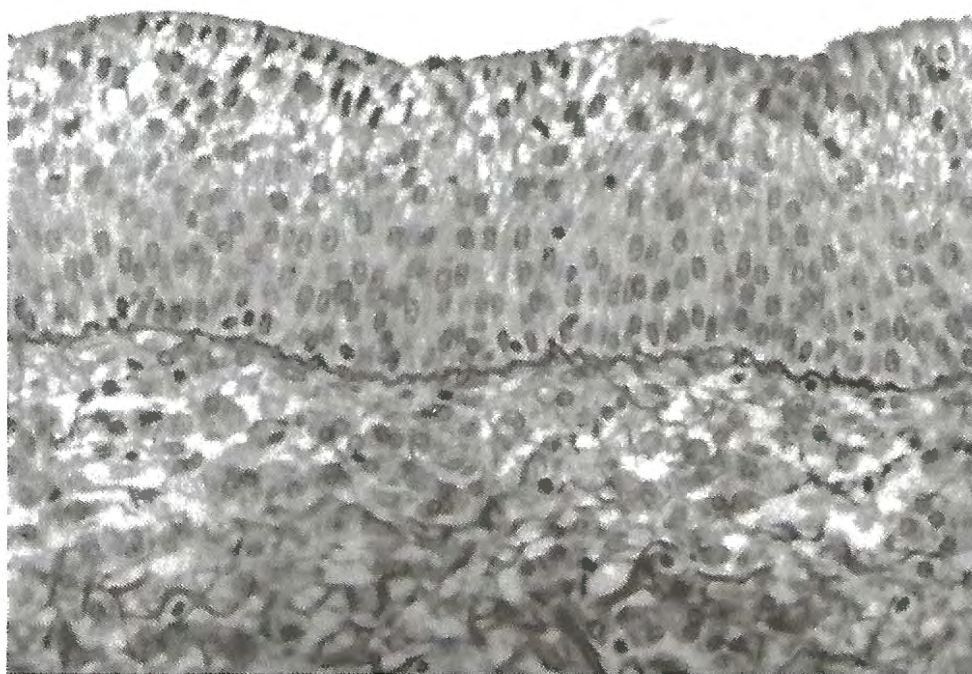



Figura 12.9 ▪ Fotomicrografia de epitélio estratificado mostrando a lâmina basal que o separa do tecido conjuntivo subjacente.

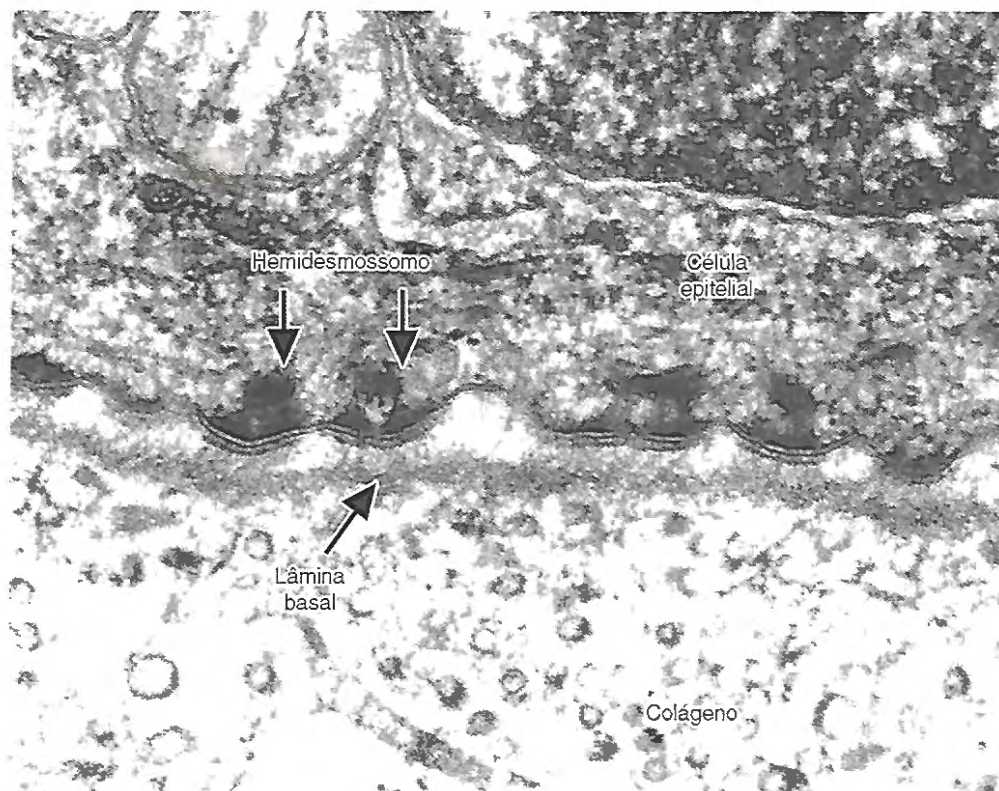



Figura 12.10 ▪ Eletromicrografia da interface de uma célula epitelial da pele com o tecido conjuntivo subjacente. Entre essas duas estruturas, apresenta-se a lâmina basal. Observe os hemidesmossomos que se prendem à lâmina basal por meio de filamentos intermediários.

Os componentes fibrilares e fibrosos (colágenos e elastina) da matriz desempenham várias funções nos tecidos

O colágeno constitui uma família de proteínas alongadas das quais quatro são as mais conhecidas; são proteínas características dos metazoários, que apareceram e se diversificaram precocemente durante a evolução, a ponto de existirem já três tipos diferentes nos espongiários. Admite-se que os colágenos se desenvolveram a partir de uma proteína inicial, que se foi diversificando, assumindo estruturas, funções e reações diferentes, de acordo com as necessidades de cada tecido. É a proteína mais abundante no organismo humano, no qual constitui 25% do total das proteínas do corpo.

Neste capítulo, são analisadas, sucintamente, as características dos quatro tipos mais conhecidos, que foram rotulados de I a IV. As moléculas de colágeno são constituídas por três polipeptídios dispostos em tripla hélice (Figura 12.11), de aproximadamente 1.000 aminoácidos cada polipeptídio.

Essas triplas hélices podem associar-se, formando estruturas com graus crescentes de polimerização. Assim é que, no colágeno tipo IV, as moléculas se associam pelas extremidades, formando uma rede com aspecto de tela de galinheiro. Nos colágenos tipos I, II e III, as moléculas se associam paralelamente, formando fibrilas visíveis somente ao microscópico eletrônico, com o diâmetro oscilando entre 20 e 300 nm. No colágeno tipo II, a polimerização estaciona na fase de fibrila, como se observa nas cartilagens. Nos colágenos tipos I e III, o processo de polimerização se acentua, e, no colágeno tipo III, essas fibrilas se agrupam, formando delgadas fibras chamadas de fibras reticulares do conjuntivo, visíveis ao microscópio óptico com 1 a 4 μm de diâmetro. No colágeno tipo I, o processo vai mais adiante e as fibras são mais espessas e frequentemente se associam, formando feixes de fibras com até 20 μm de diâmetro, constituindo o que normalmente se chama de fibras de colágeno do tecido conjuntivo (Figura 12.12).

O colágeno tipo II é característico das cartilagens e se associa intimamente com proteoglicanas que contêm sulfato de condroitina, que lhe emprestam uma característica de com-

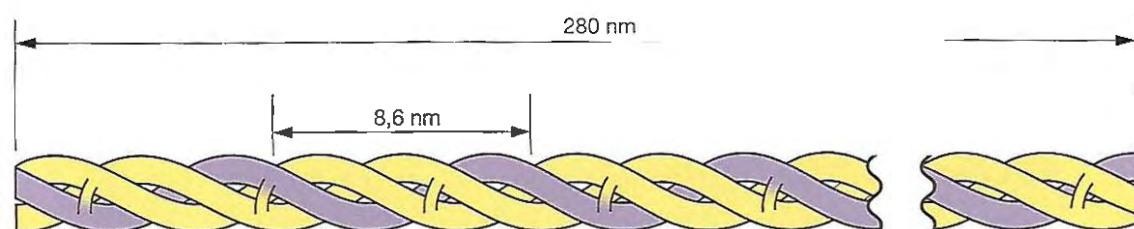



Figura 12.11 ▪ Ilustração da constituição da molécula de colágeno formada por três cadeias polipeptídicas enroladas em espiral.

Região lacunar
Região de sobreposição
280 nm
Fibrila
Fibra
Feixe
Região lacunar
Região de sobreposição

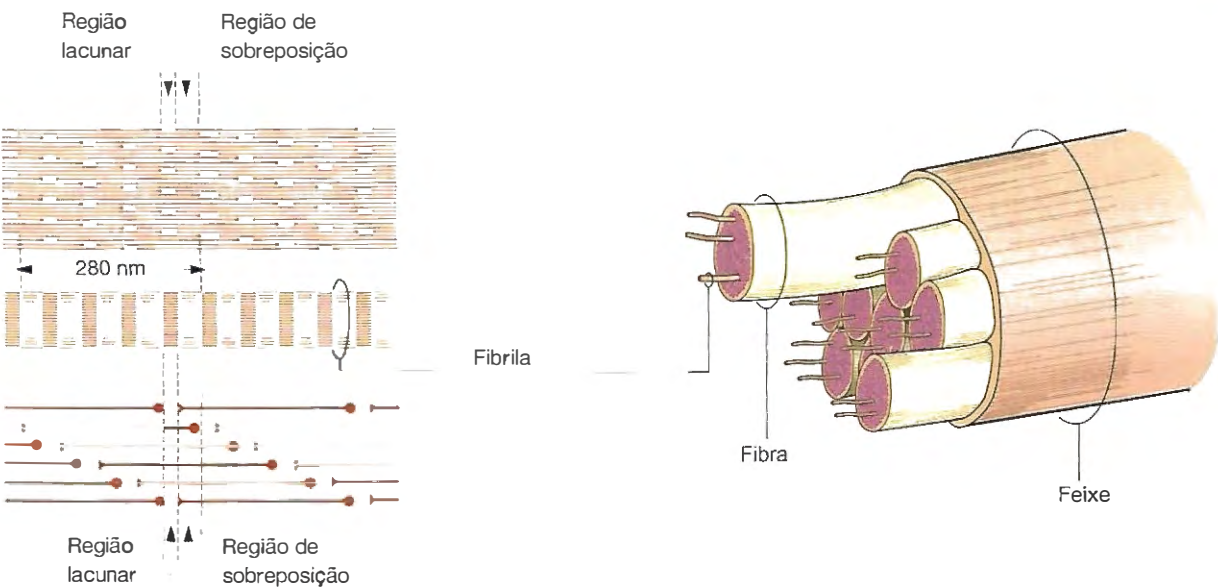



Figura 12.12 ▪ Desenho esquemático do processo de polimerização gradual do colágeno nas fibras de colágeno, constituídas por colágeno tipo I. As moléculas de colágeno se associam paralelamente, formando fibrilas que aparecem com estrias transversais ao microscópio eletrônico. Inúmeras fibrilas se agrupam formando uma fibra, e várias fibras constituem um feixe. As moléculas de colágeno tipo IV não se associam paralelamente. O colágeno tipo II forma fibrilas apenas. No colágeno tipo III, as fibrilas se associam, formando fibras. O colágeno do tipo I é o único que produz fibras e feixes de fibras.

pressibilidade reversível em razão da alta hidrofilia das proteoglicanas. Funciona, pois, grosso modo, como uma esponja que perde água quando comprimida e se embebe novamente em água voltando à forma inicial, quando a pressão é retirada. Faz, portanto, o papel de uma mola de natureza físico-química, característica essa importante para as cartilagens das articulações sujeitas a pressões.

O colágeno tipo III é encontrado em tecidos que alteram seu volume e sua forma com frequência, como nas artérias, no músculo liso do trato digestivo, no útero etc. Nesse tipo de colágeno ocorrem, com frequência, pontes de proteoglicanas entre as fibrilas de colágeno, emprestando às fibras reticulares características de elasticidade limitada, porém importante para esses órgãos.

O colágeno tipo I, presente na derme, ossos e tendões, apresenta múltiplas e fortes ligações covalentes entre suas fibrilas. Essas ligações cruzadas alcançam o seu grau máximo nos tendões. O colágeno tipo I é bem adaptado principalmente para resistir às tensões. A Tabela 12.1 mostra as principais características desses quatro tipos de colágeno.

Os colágenos são proteínas que sofrem inúmeras alterações pós-traducionais, que se processam principalmente no interior das cisternas do retículo endoplasmático rugoso e, também, no meio extracelular. Consequentemente, a sua síntese é mais complexa do que a da maioria das proteínas, o que explica o elevado número de doenças resultantes da síntese defeituosa do colágeno.

Muitas das doenças do colágeno são devidas a alterações gênicas e provocam afrouxamento dos tendões, ligamentos e pele. Esses sintomas podem ser causados por várias alterações da síntese do colágeno e foram agrupados nas síndromes de Ehlers-Danlos, da qual existem oito variedades clínicas conhecidas (síndrome é um estado mórbido caracterizado por um conjunto de sintomas). Geralmente, os contorcionistas de circo são portadores da síndrome de Ehlers-Danlos.

Enfraquecimento do colágeno dos vasos sanguíneos e dos ligamentos dentários causa hemorragias frequentes e queda dos dentes, sintomas característicos do escorbuto, doença causada pela carência de vitamina C, cofator indispensável para síntese de colágeno.

As fibras elásticas são abundantes em estruturas como pele, artérias e pulmões, o que proporciona elasticidade a esses órgãos. As fibras elásticas apresentam a capacidade de se distenderem quando tracionadas, voltando logo depois ao seu

Tabela 12.1 ▪ Características dos quatro tipos principais do colágeno.

Tipo	Distribuição	Células produtoras	Grau de polimerização	Função
I	Derme, tendão, osso, pigmentos (fibras de colágeno)	Fibroblastos	*Máxima* – fibras e feixe de fibras	Resistir à tensão
II	Cartilagens	Condrócitos	*Pequena* – só forma fibrilas	Resistir à pressão
III	Músculo liso, órgão hemopoético, nervos (fibras reticulares)	Músculo liso, células reticulares	*Média* – só forma fibras finas	Resistir à tensão
IV	Lâminas basais	Células epiteliais, endoteliais, musculares	*Nenhuma* – as moléculas se associam formando uma malha submicroscópica	Suporte, filtração, barreira

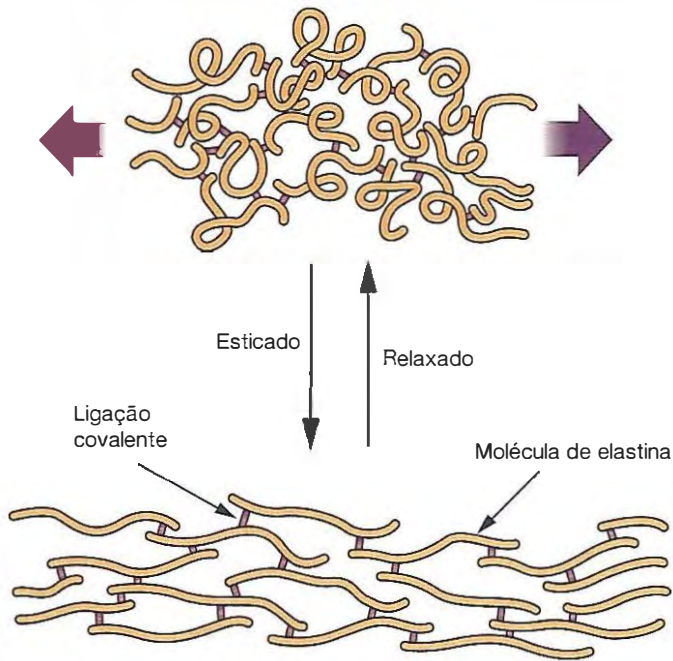



Figura 12.13 ▪ Desenho do modelo mais aceito para explicar a elasticidade das fibras elásticas. As moléculas de elastina, parcialmente enoveladas, prendem-se por suas extremidades por meio de ligações covalentes. Quando as fibras são esticadas, as moléculas de elastina se desenrolam, voltando à posição inicial uma vez terminada a força exercida.

comprimento normal, quando a força da tração é interrompida. A elasticidade das fibras elásticas é, no mínimo, cinco vezes maior do que a de um filamento de borracha do mesmo diâmetro. Elas são constituídas essencialmente por uma glicoproteína (elastina) altamente hidrofóbica cujas moléculas, parcialmente enoveladas, se prendem entre si por ligações covalentes entre suas extremidades (Figura 12.13). A elastina se agrega formando fibras, que se anastomosam para constituir uma rede (Figura 12.14), como na pele e no pulmão. Na parede das grandes artérias, a elastina se dispõe em lamelas paralelas umas às outras.

Ao lado da elastina, que aparece amorfa nas micrografias eletrônicas, as fibras elásticas apresentam ainda uma quantidade variável de microfibrilas constituídas por diversas glicoproteínas, como a fibrilina, uma glicoproteína de elevada massa molecular.

Mutação no gene que codifica fibrilina, localizado no cromossomo 15, causa a síndrome de Marfan, caracterizada por hiperextensibilidade das articulações, deslocamento do cristalino do globo ocular com deficiência visual e dilatação da artéria aorta. A dilatação e enfraquecimento da parede da aorta pode levar à ruptura desse vaso sanguíneo e à hemorragia muito grave.

As fibras elásticas da pele tendem a degenerar com a idade, sendo parcialmente responsáveis pelas rugas, processo esse muito acelerado pela exposição excessiva à luz solar.

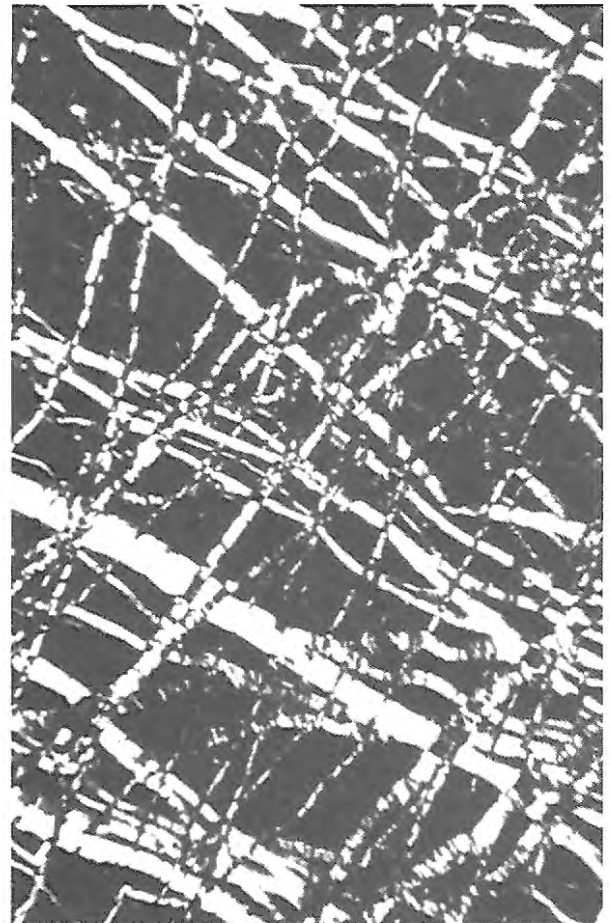
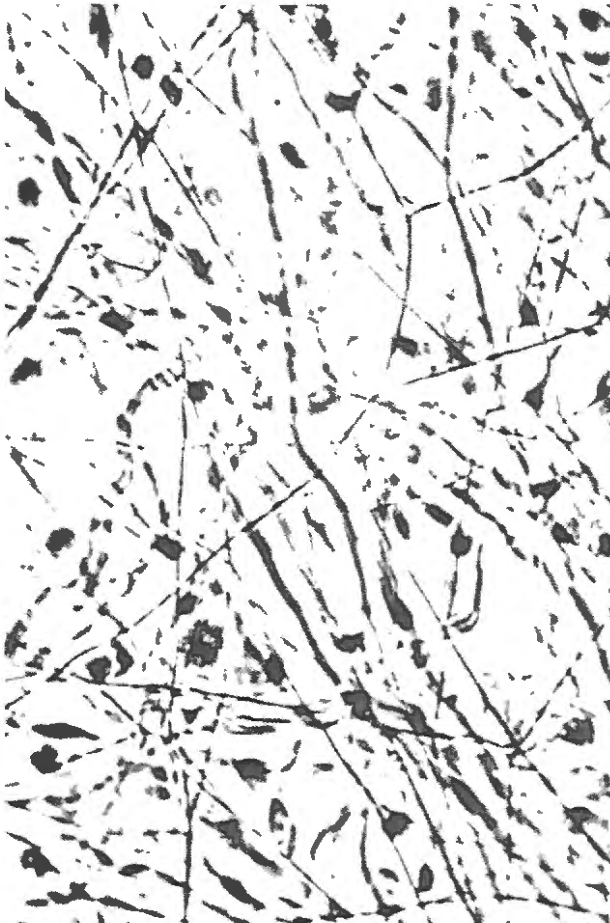



Figura 12.14 ▪ Fotomicrografias mostrando fibras colágenas e elásticas. Na fotomicrografia da *esquerda*, nota-se que as fibras elásticas são finas, regulares e se anastomosam, ao passo que as colágenas são irregulares e não se anastomosam. A fotomicrografia da *direita*, feita com microscopia de polarização, mostra as fibras de colágeno claras, contra um fundo escuro. Isso se deve à birrefringência das fibras colágenas, consequência da orientação paralela das moléculas de colágeno, que desviam o plano da luz polarizada. Aumento de 300×.

Resumo

Os tecidos dos animais e vegetais são constituídos por células e por material extracelular produzido pelas células. Esse material recebe o nome de matriz extracelular.

Por meio de moléculas proteicas integrais da membrana plasmática, estabelece-se continuidade entre o interior da célula e a matriz extracelular. Moléculas do citoesqueleto se prendem a proteínas da membrana, que são receptores para macromoléculas da matriz extracelular, estabelecendo uma conexão entre o citoesqueleto e a matriz extracelular.

Um componente importante da matriz é a lâmina basal, que se dispõe entre os tecidos epiteliais, células musculares, capilares sanguíneos e linfáticos, e o tecido conjuntivo.

A matriz tem significado funcional muito amplo nos tecidos, participando da manutenção da estrutura, do desenvolvimento embrionário e pós-natal, da proliferação celular, da regeneração, da nutrição e de processos patológicos.

Os componentes fibrilares da matriz são os diversos tipos de colágeno e as fibras elásticas. Os principais componentes não fibrilares são glicoproteínas multiadesivas como a fibronectina e a laminina, e as glicosaminoglicanas, que geralmente estão associadas a proteínas, formando as proteoglicanas.

Bibliografia

Geiger, B. and Ayalon, O.: Cadherins. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**:307, 1992.

Gumbiner, B.: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**:345, 1996.

Hay, E.D. (ed): *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd ed. Plenum, 1991.

Horwitz, A.F.: Integrins and health. *Scient. Amer.*, **276(5)**:46, 1997.

Horwitz, A.F. and Thiery, J.P. (eds.): Cell-to-Cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**:645, 1994.

Hudson, B.G., Reeders, S.T. and Tryggvason, K.: Type IV collagen: Structure, gene organization, and role in human diseases. *J. Biol. Chem.*, **268**:2603, 1993.

Kjellen, L. and Lindahl, U.: Proteoglycans: Structure and interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, **60**:443, 1991.

Kucharz, E.J.: *The Collagens. Biochemistry and Pathology.* Springer-Verlag, 1992.

McDonald, J.A. and Meecham, R.P. (eds.) *Receptors for Extracellular Matrix.* Acad. Press, 1991.

Mecham, R.P.: Laminin receptors. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7:71, 1991.

Schwartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg, M.H.: Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**:549, 1995.

Stanley, J.R.: Autoantibodies against adhesion molecules and structures in blistering skin diseases. *J. Exp. Med.*, **181**:1, 1995.

13 Célula Vegetal

Berenice Quinzani Jordão
Celia Guadalupe T. J. Andrade

Roteiro

- Juntamente com os vacúolos e uma parede rígida, os plastídeos são componentes típicos das células vegetais
- Todas as células vegetais têm uma parede celular primária, e várias têm uma parede secundária. A celulose é o principal componente da parede
- As células vegetais apresentam um vacúolo que ocupa de 5 a 95% do volume celular
- O vacúolo tem um papel importante no crescimento e na manutenção do turgor celular; também atua na degradação de macromoléculas e serve de depósito de substâncias
- O citoesqueleto das células vegetais é composto por microtúbulos e filamentos de actina, determinantes no crescimento celular e na geração de corrente citoplasmática
- Os plastos, que só existem nas células vegetais, são de diferentes tipos e contam com genoma próprio como as mitocôndrias
- Os cloroplastos executam a fotossíntese
- Existem plantas que fixam CO_2 em compostos de 3 carbonos e outras que o fixam em compostos de 4 carbonos: são as plantas C_3 e C_4
- A fotorrespiração é um processo que envolve trocas gasosas na presença de luz, típico de plantas C_3
- Os peroxissomos participam da fotorrespiração nas folhas, e os glioxissomos, da transformação de lipídios em glicídios, nas sementes oleaginosas
- Ténicas como fusão de protoplastos, cultura celular e criação de plantas transgênicas são usadas na biotecnologia vegetal.

As células vegetais se assemelham às animais em muitos aspectos de sua morfologia, como a estrutura molecular das membranas e de várias organelas. Também são semelhantes em vários mecanismos moleculares básicos, como a replicação do DNA e sua transcrição em RNA, a síntese proteica e a transformação de energia via mitocôndrias. Diferem, porém, em algumas características morfofisiológicas importantes. Juntamente com a presença de uma parede celular rígida e o desenvolvimento de um grande vacúolo utilizado para vários fins, os plastídeos são componentes característicos das células vegetais (Figuras 13.1 e 13.2). Eles conferem a essas células a capacidade de sintetizar compostos orgânicos, utilizando CO_2 e a energia da luz solar, por meio de um processo complexo chamado fotossíntese. Também existem diferenças importantes entre as células vegetais e as animais quanto à organização do DNA e à estrutura e à expressão da cromatina e dos cromossomos; no entanto, essas diferenças são de interesse mais específico da área de citogenética vegetal, assunto que foge do âmbito deste livro.

A parede das células vegetais é um tipo de matriz extracelular rígida

A presença de uma parede celular rica em polissacarídios foi sempre relacionada como uma característica que, acima de todas as outras, distingue as células vegetais das células animais. Deve-se considerar, porém, que, assim como os vegetais, os tecidos animais também apresentam uma cobertura constituída por grande proporção de carboidratos; em ambos os casos, trata-se da chamada matriz extracelular. Especialmente nas plantas, é secretada como uma camada organizada que constitui, frequentemente, uma estrutura espessa, rígida e forte, altamente complexa e, ao mesmo tempo, dinâmica ao longo da transição do estágio juvenil para o estágio adulto da planta.

A parede celular impede a mobilidade das células, participa da aderência, da aglutinação celular, da interação com células vizinhas e influi no crescimento, na nutrição, na reprodução e na defesa. Ela reúne propriedades mecânicas que lhe per-

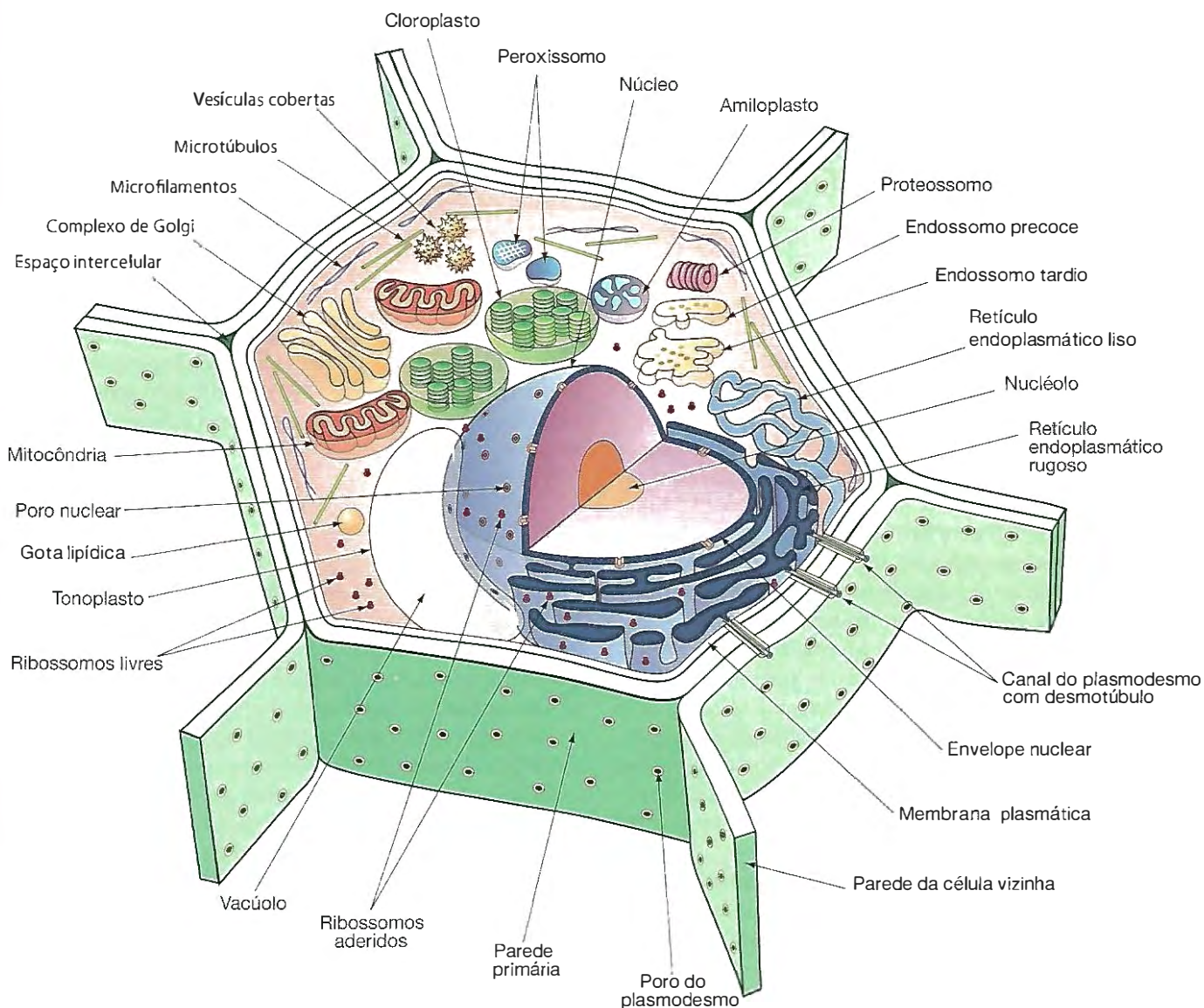



Figura 13.1 ▪ Esquema representativo da estrutura de uma célula vegetal, caracterizada pela presença de parede celular com plasmodesmos, cloroplastos e vacúolo, único ou múltiplo, que pode ocupar até 95% do volume citoplasmático.

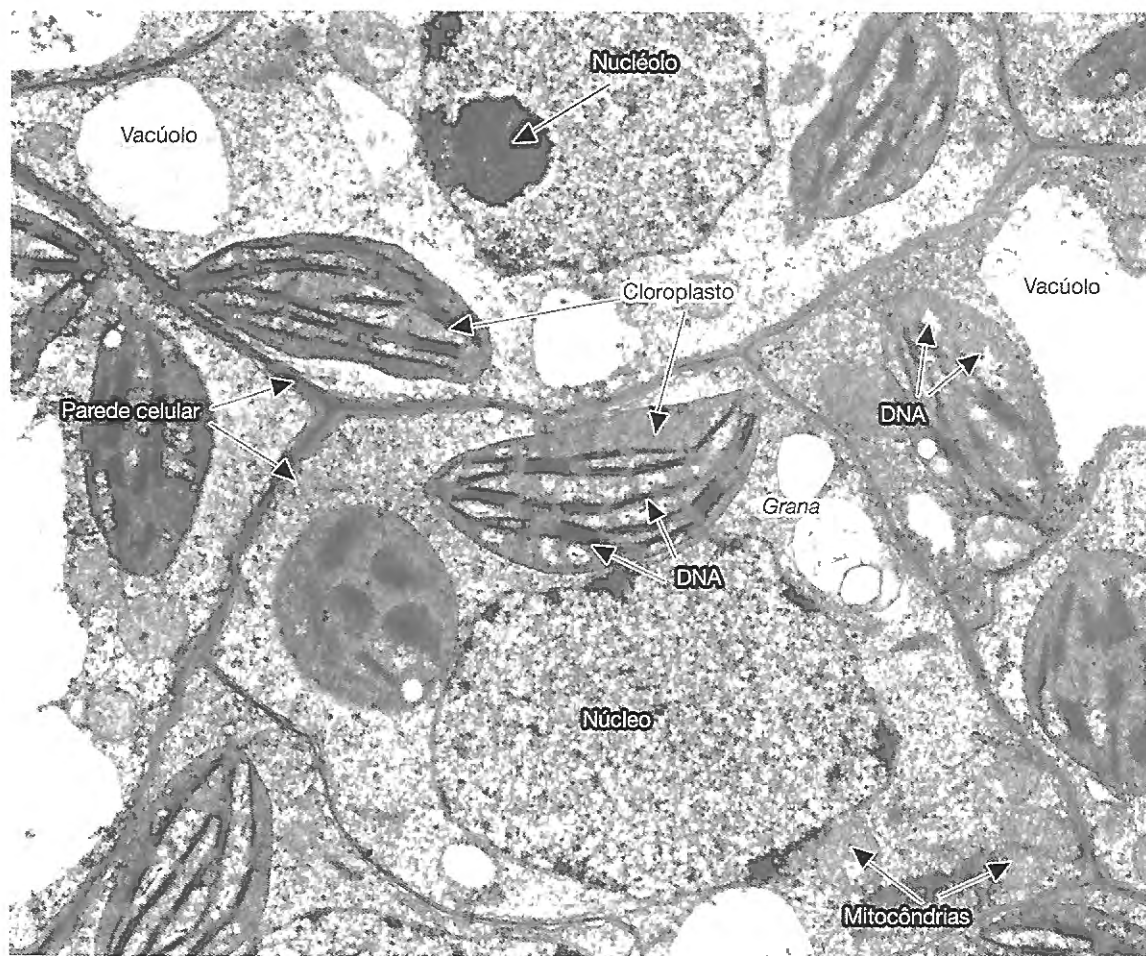



Figura 13.2 ▪ Eletromicrografia de corte de folha de chuchu (*Sechium edule L.*). Observar os núcleos, nucléolo, cloroplastos, vacúolos, mitocôndrias e parede celular. 7.000×. (Cortesia de E. W. Kitajima.)

mitem tanto suportar forças de tensão e de compressão como também regular a expansão e a adesão celulares. Além disso, a parede auxilia na manutenção da integridade osmótica da célula, protegendo-a contra os efeitos da baixa pressão osmótica externa, já que, nas plantas, o líquido extracelular é hipotônico, ao contrário do que acontece nos animais, nos quais as células estão mergulhadas em um meio isotônico. Muitas vezes, constitui-se em uma barreira protetora contra lesões e infecções, ao impermeabilizar a superfície de folhas e frutos, evitando o ataque de organismos patogênicos. Por ser rígida e forte, a parede celular garante sustentação, agindo como esqueleto da planta. Ela determina o formato celular e a forma da própria planta. As paredes celulares apresentam, ainda, enorme importância econômica, uma vez que se constituem em uma significante fonte de alimento, combustível, madeira, papel, fibras têxteis e matéria-prima de outros produtos industriais, como colas, espessantes industriais e aditivos alimentares; em uma perspectiva futura, espera-se que se torne fonte para produção de biocombustíveis.

Nas plantas, existem dois tipos de parede: parede celular primária e parede celular secundária. A primária é a primeira que se desenvolve em uma célula jovem (Figura 13.3) e é a única presente na maioria das células, como naquelas que se dividem ativamente ou nas células maduras envolvidas em processos metabólicos, como fotossíntese, respiração e secreção; essas são as células vivas. A parede secundária é secretada por células que necessitam de resistência e reforço estrutural, e, em geral, depois da sua deposição, a célula para de crescer e morre. Ela se forma na superfície interna da parede primária durante a diferenciação de xilema, floema e de células especializadas na função de sustentação.

As paredes se originam ao final de cada divisão celular, geralmente em tecidos especializados em proliferação celular, denominados meristemas. As células recém-constituídas são pequenas, em comparação com o tamanho que assumem quando completamente desenvolvidas. Suas paredes devem possibilitar o crescimento das células, sendo então delgadas e semirrígidas (Figura 13.3A). Inicialmente, são formadas exclusivamente por uma camada muito fina, transparente e permeável, denominada lamela média, que é composta por um tipo especial de polissacarídio (pectina) de natureza gelatinosa e cimentante. Depois que a citocinese se completa, microfibrilas de celulose são entrelaçadas ao redor das células-filhas recém-formadas, contribuindo para a formação das suas paredes primárias (Figura 13.3B). Outro estágio do desenvolvimento da parede ocorre com o crescimento celular e envolve o aumento da espessura e da superfície da parede primária, pela adição de polímeros não celulósicos e de outros compostos sintetizados e secretados pelas próprias células adjacentes. Essa elongação celular deve ser coordenada entre células vizinhas para evitar que a parede se dobre ou se rompa. Isso é alcançado com a deposição de novos materiais nas paredes laterais que

ficam paralelas ao eixo de crescimento, e não nas paredes que limitam os tecidos. Depois de cessado o crescimento celular, a parede não mais necessita se expandir, ocorrendo, então, em algumas células, a formação da parede secundária. Ela ocorre por um simples espessamento da parede primária ou, na grande maioria dos casos, surge como uma nova parede, que se forma pela deposição de novas camadas e de composição química diferente, entre a parede primária e a membrana plasmática. Esses três componentes das paredes celulares, lamela média, parede primária e parede secundária, no entanto, são dificilmente distinguíveis como camadas isoladas, em observações feitas ao microscópio de luz comum.

Por meio da interação das paredes celulares é que os tecidos vegetais se organizam. Esta interação não é completa. Com exceção do tecido meristemático, nos demais tecidos é comum a existência de espaços intercelulares bem desenvolvidos, com funções importantes, como é o caso do tecido de reserva de ar, aerênquima, encontrado nas folhas flutuantes e em órgãos submersos de plantas aquáticas. Esses espaços intercelulares podem se desenvolver pela separação das paredes primárias, pela cisão da lamela média. A cisão inicia-se nos cantos, onde mais de duas células estão unidas (Figuras 13.1 e 13.3), seguindo para as outras áreas da parede; os que são assim formados são denominados esquizógenos. Exemplos muito comuns de espaços intercelulares com esta origem são os denominados meatos e os canais resiníferos dos pinheiros. Um segundo tipo de espaço intercelular é o lisígeno, quando células inteiras são destruídas durante a sua formação. A este tipo pertencem as cavidades ou os canais secretores, presentes em folhas de laranjeira e de eucalipto.

Composição química: a parede celular é constituída por fibrilas de celulose embebidas em uma matriz de outros componentes

A composição das paredes varia consideravelmente de uma célula para outra, de um órgão para outro e de espécie para espécie; no entanto, elas são essencialmente compostas por polissacarídios e proteínas. Os componentes mais abundantes em todas as paredes celulares são os polissacarídios estruturais, formados por longas cadeias de açúcares, de alto peso molecular, ligados uns aos outros tanto por ligações iônicas como por ligações covalentes, que resistem à penetração física. Os tipos de polissacarídios mais comuns são três: celulose, principal componente, e os polissacarídios não celulósicos hemiceluloses e pectinas ou compostos pécticos. Também a calose, outro tipo de polissacarídio, pode estar presente. Na maioria das células, esta é sintetizada somente em resposta a lesões e, em poucas células, deposita-se em estágios específicos do desenvolvimento, como ocorre no tubo polínico em crescimento, na formação da tétrade do gametófito masculino (Figura 13.4), no floema durante o inverno e na parede inicial em formação durante a citocinese. Nas paredes celulares, as proteínas estruturais formam o segundo componente mais importante. As paredes contêm ainda minerais e, nos últimos estágios de seu desenvolvimento, podem apresentar grandes quantidades de lignina. As células que recobrem os órgãos aéreos podem também apresentar compostos lipídicos, como ceras, cutina e suberina. Assim, os componentes são variáveis, em tipo e

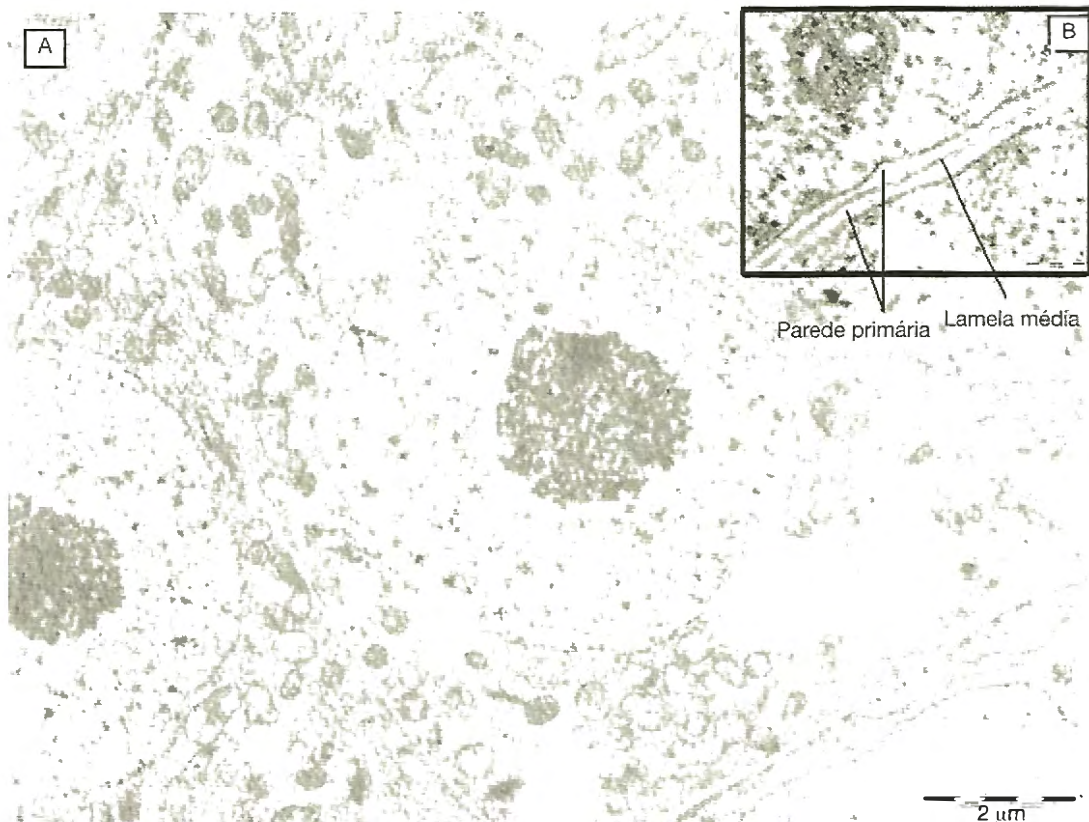



Figura 13.3 ▪ Eletromicrografia de corte de antera de *Rhynchospora pubera*, mostrando célula-mãe de pólen (célula jovem) envolta por parede celular, a qual é mostrada em B, *em detalhe*, onde se vê a parede primária das duas células contíguas e a lamela média entre elas. **A.** 5.800×; **B.** 135.000×. (Cortesia de J. A. B. San Martin.)

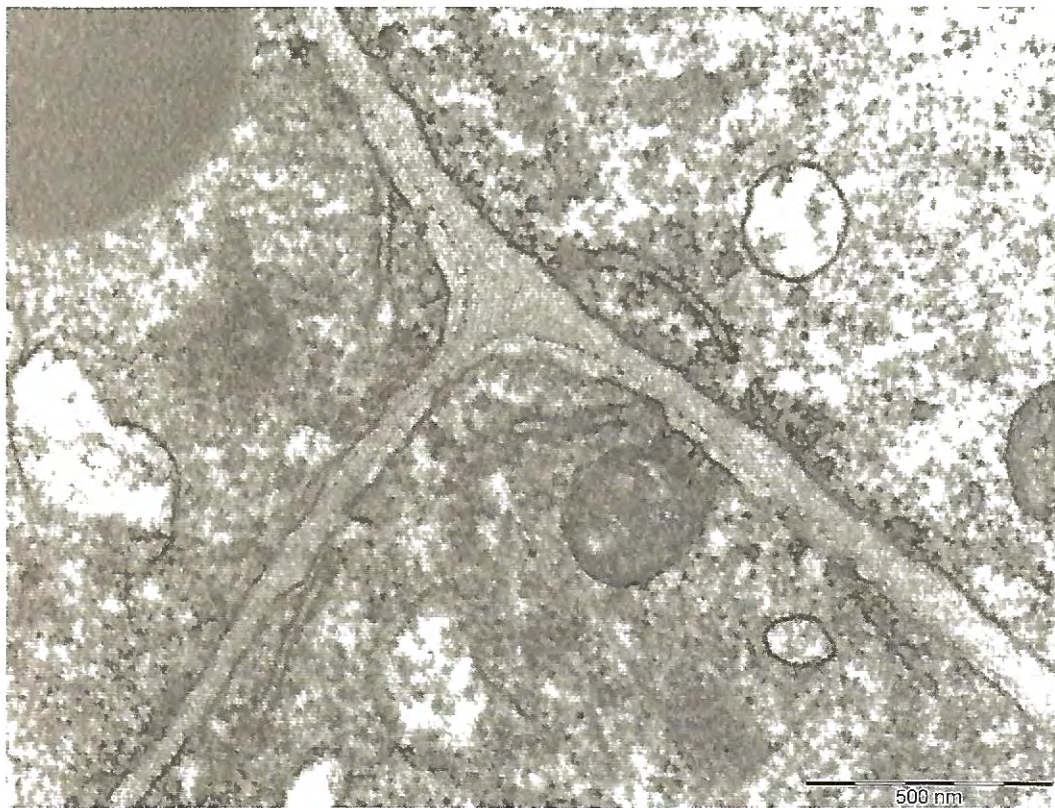



Figura 13.4 ▪ Eletromicrografia de corte de antera de *Rhynchospora pubera*, mostrando células do meiócito, limitadas por parede celular de calose. 37.000×. (Cortesia de J. A. B. San Martin.)

proporção, não só com a fase de crescimento da planta, mas também com o tecido ou órgão analisado.

De modo geral, enquanto a lamela média é predominantemente rica em pectinas, a parede primária consiste em, aproximadamente, 90% de polissacarídios, dos quais cerca de 20 a 40% são representados pela celulose, 15 a 25% por hemiceluloses e 30% por pectinas, além de cerca de 10% de proteínas estruturais e enzimáticas, e considerável teor de água. Já a parede secundária é relativamente enriquecida em celulose, que constitui 60 a 98% da sua massa, e hemiceluloses. Nela não existem, ou são baixas, as porcentagens de pectinas e proteínas. A lignina, presente em 15 a 35% de sua massa seca, provavelmente ocupa muito do espaço originalmente ocupado pela água, convertendo o estado da matriz de um gel viscoso em um cimento relativamente rígido, não elástico.

▪ Celulose

Nos vegetais, é o polissacarídio estrutural mais abundante e, assim, o mais abundante e útil biopolímero do mundo. Constitui-se de cadeias de unidades repetidas (monômeros) de D-glicose (cuja fórmula é $C_6H_{12}O_6$), ligadas covalentemente pelo oxigênio entre o carbono número 1 de uma glicose e o carbono número 4 da próxima glicose [ligações β(1→4)], gerando um polímero linear e não ramificado, que apresenta forte tendência à autoassociação (Figura 13.5A). (*O beta* – β – *refere-se a um monômero cuja hidroxila no carbono número 1 aponta para cima. Quando esta aponta para baixo, tem-se uma configuração alfa* – α). Cada glicose sofre um giro de 180° em relação ao monômero anterior, o que favorece a formação de um grande número de pontes de hidrogênio tanto inter como intracadeias, que se dispõem paralelas entre si (Figura 13.6). Esse arranjo molecular rígido confere à cadeia de celulose alta insolubilidade em água e grande resistência às forças de tração. Esse polímero apresenta uma força de tensão aproximadamente igual a uma fibra de aço do mesmo diâmetro. O número de unidades de glicose em cada cadeia pode variar de cerca de 8.000, na parede primária, a 14.000 a 15.000 na parede secundária. A típica interação de aproximadamente 36 dessas cadeias por meio de pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals gera estruturas cristalinas muito organizadas e fortes chamadas microfibrilas, as quais, individualmente, medem cerca de 3 a 5 nm de diâmetro e muitos micrômetros de comprimento (são longas o suficiente para enrolar-se ao redor de uma célula muitas vezes). A disposição paralela dessas moléculas reforça a ideia de que as cadeias de uma microfibrila são feitas simultaneamente. O nível de agregação, no entanto, pode ser ainda maior, uma vez que cerca de 250 microfibrilas se interligam para constituir fibrilas de celulose e, por último, em torno de 1.500 fibrilas podem ainda se enrolar como fios dentro de um cabo, formando uma fibra de celulose. Cada fibra mede cerca de 0,5 mm de diâmetro e pode atingir 5 mm de comprimento. Dentro das próprias microfibrilas, ocorrem pequenos agregados de moléculas de celulose altamente ordenadas, gerando regiões cristalinas denominadas micelas, as maiores responsáveis pela birrefringência positiva da parede. Os espaços entre as moléculas arranjadas menos regularmente nas microfibrilas e entre as camadas de microfibrilas são preenchidos com os compostos altamente hidrofílicos da matriz (pectinas, proteínas e hemiceluloses), que formam uma rede tridimensional hidrofílica, responsável pela permeabilidade da parede celular e que permite, em maior ou menor intensi-

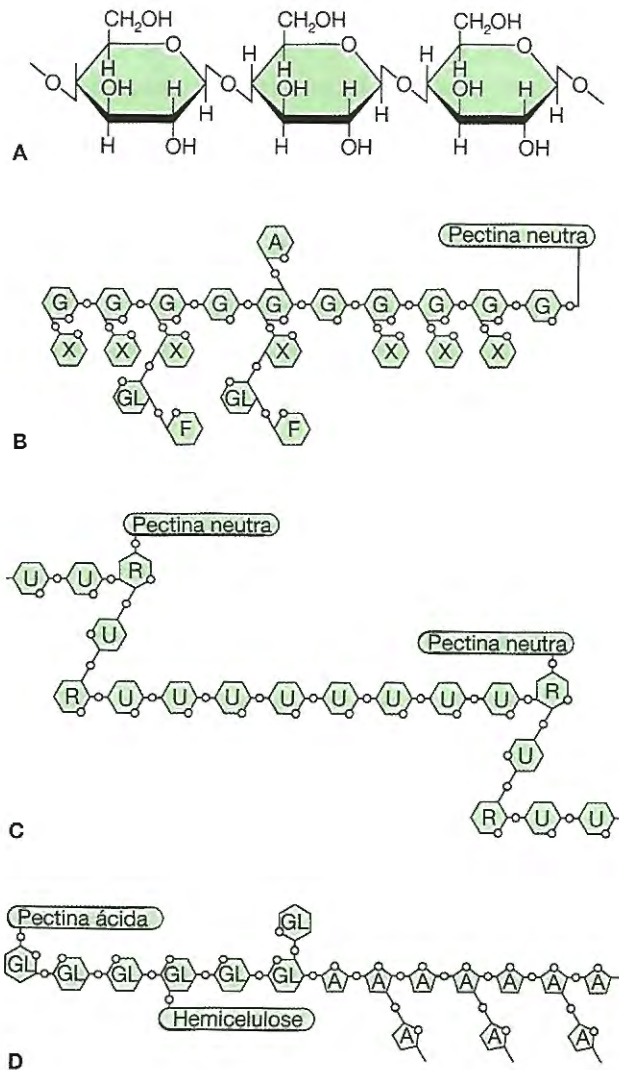



Figura 13.5 ▪ Polissacarídios constituintes da parede celular. **A.** Fragmento da molécula de celulose que consiste inteiramente em monômeros de β-glicose, representados por estruturas em forma de anel, unidos por ligações 1→4. Observe que resíduos adjacentes têm orientações opostas, invertendo-se, alternativamente, para manter a linearidade do polímero. **B.** Molécula de xiloglicano, um exemplo de hemicelulose. **C.** Ramnogalacturonano, cuja estrutura representa uma molécula de pectina ácida. **D.** Pectina neutra exemplificada por uma molécula de arabinogalactano. Nessas cadeias, os resíduos de açúcares são representados pelas seguintes letras: G: glicose; X: xilose; GL: galactose; F: fucose; A: arabinose; U: ácido galacturônico; R: ramnose. Observe que são mostradas as ligações que se estabelecem entre cada uma dessas cadeias polissacarídicas e os demais polissacarídios da parede.

dade, a troca de nutrientes, de catabólitos e de sinais químicos entre as células e o meio extracelular (Figura 13.6). Na parede secundária, esses espaços são preenchidos também por componentes não polissacarídicos.

▪ Hemiceluloses

A hemicelulose pertence a uma classe extremamente heterogênea de polímeros de pentoses, compostos por diferentes tipos de monômeros além da glicose, cujas cadeias são ramificadas com cadeias laterais curtas. As hemiceluloses são classificadas de acordo com o tipo de açúcares que as compõem. A categoria mais abundante de hemiceluloses presente nas paredes celulares primárias da maioria das espécies, mono e dicotiledôneas, é constituída pelos xiloglicanos (Figura 13.5B). Esses polissacarídios têm uma cadeia principal formada por glicoses unidas por ligações β(1→4), regularmente ramificada com unidades de D-xilose. Também podem conter outro tipo de ramificação, mais longa, na qual uma galactose e uma fucose ligam-se à xilose. Essa estrutura varia entre as espécies. Outras categorias de hemiceluloses incluem, por exemplo, os xilanos, cujo nome está relacionado com o seu esqueleto de xiloses, e os glicomananos, que, como o nome sugere, são compostos predominantemente de glicose e manose. Nas gramíneas, em que as hemiceluloses são predominantes, os xiloglicanos são substituídos pelos glicuronoarabinoxilanos (que contêm principalmente xilose, com menores quantidades de arabinose, galactose e ácido urônico). Dentre as hemiceluloses, também se encontram outros polímeros compostos inteiramente de resíduos de glicose, com ligações glicosídicas não só do tipo β(1→4), mas também do tipo β(1→3); um desses poliglicanos é a calose. Entretanto, as hemiceluloses não são compostas exclusivamente de açúcares; também apresentam grupos metil e acetil em sua estrutura.

As moléculas de hemicelulose têm sempre alguma característica estrutural que as impede de formar agregados, mas todas elas se ligam por pontes de hidrogênio às microfibrilas de celulose, constituindo uma rede estrutural muito complexa. Nas plantas, existem ainda outras hemiceluloses não estruturais. Elas são exsudatos de caules, raízes, folhas ou frutos, genericamente denominados de gomas, entre as quais a mais conhecida é a goma arábica.

▪ Pectinas

As pectinas, ou compostos pécticos, são polissacarídios complexos, altamente ramificados e hidrófilos, que compreendem vários tipos de cadeias polissacarídicas caracterizadas pela presença de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações α(1→4). Um dos mais importantes grupos de pectinas é o dos ácidos poligalacturônicos ou poligalacturonanos, que são homopolímeros helicoidais, nos quais alguns dos seus grupamentos carboxila ou todos eles podem estar metilados. Em outro grupo estão os ramnogalacturonanos, que são heteropolímeros, em que, além do ácido D-galacturônico, ocorrem unidades de L-ramnose, cuja presença sugere a conformação em "zigue-zague" assumida pelas moléculas (Figura 13.5C). Cadeias laterais de açúcares ou polissacarídios neutros, de várias configurações ou tamanhos, principalmente arabinoses, galactoses e arabinogalactanos, podem ligar-se a muitos resíduos de ramnose, constituindo ramificações do esqueleto poliurônico. Assim, as pectinas podem variar consideravelmente em composição e tamanho. Há moléculas que são altamente acídicas, chamadas de pectinas ácidas (Figura 13.5C), ricas em ácido galacturônico não metilado, alongadas e relativamente não ramificadas, em contraste com moléculas apenas levemente acídicas, chamadas de pectinas neutras (Figura 13.5D), com muitos de seus grupos carboxilas metilados e com longas cadeias neutras laterais. Além disso, cadeias de ácidos poligalacturônicos podem condensar-se com alguns cátions bivalentes, sobretudo com íons Ca^{2+}, que formam ligações cruzadas entre os grupos carboxila de várias cadeias adjacentes, o que resulta em complexos macromoleculares gigantes, na forma de um gel, denominados zonas de junção. Esse

gel hidratado de pectinas preenche o espaço entre as camadas fibrosas de celulose e desempenha importante papel funcional, facilitando o crescimento celular, controlando a passagem de íons e moléculas e atuando como barreira que determina a porosidade da parede, ou seja, o tamanho das moléculas que podem atravessá-la e atingir as células. Íons e moléculas pequenas, como água e sacarose, passam livremente pela parede, mas moléculas que têm acima de 15.000 dáltons são barradas. A maioria das moléculas que regula o crescimento nas plantas (hormônios vegetais), como as auxinas, citocininas e giberelinas, tem peso molecular abaixo de 500 dáltons. Pectinas são o alvo primário do ataque de organismos invasores, e os produtos resultantes de sua quebra são potentes desencadeadores de respostas de defesa celular. Também, por terem consistência gelatinosa, elas têm utilidade comercial, sendo usadas na fabricação de doces e geleias.

Proteínas

Três tipos de proteínas são identificados na parede celular em função de suas interações com os demais componentes da parede: (a) as denominadas "proteínas lábeis", de pouca ou nenhuma interação, que se movem livremente no espaço extracelular; (b) as "fracamente ligadas" por forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas ou iônicas, a maioria das quais é carregada positivamente, o que possibilita a interação com pectinas, que têm cargas negativas; e (c) as que são "forte ou covalentemente ligadas" aos demais componentes da parede. Dentre as últimas estão as proteínas estruturais da parede. A mais importante delas é uma glicoproteína denominada extensina, bastante rica no aminoácido hidroxiprolina, que é inserida na parede durante o crescimento da parede primária. A síntese da extensina é induzida quando as células são danificadas por ferimento, infecção ou congelamento, e, assim, de alguma maneira, ela ajuda a proteger ou a reparar as células. As proteínas estruturais interagem covalentemente com os polissacarídios e têm importante papel na organização da arquitetura e resistência das paredes. Existem proteínas que exercem função enzimática, como as peroxidases, que podem ter alta afinidade por pectato de Ca^{2+}, as endotransglicosilases de xiloglicanas, que quebram e refazem ligações glicosídicas, e uma família de endoglicanases, que digerem diferentes glicídios. Entre as proteínas de parede, incluem-se também as expansinas, que atuam em pH ácido afrouxando a parede, ainda que não tenham atividade enzimática. Para esse fim, as expansinas provocam o deslizamento entre as moléculas de polissacarídios, em consequência da quebra e da formação de novas pontes de hidrogênio entre eles. Ainda as proteínas das paredes podem ter papel no desenvolvimento da planta, reconhecimento, sinalização, interações com proteínas da membrana plasmática, defesa, inibindo o crescimento de muitos patógenos e adaptação ao ambiente.

Lignina

Outro componente não polissacarídico da parede é a lignina, um polímero fenólico complexo, que consiste em álcoois fenilpropanoides e seus ácidos correspondentes, de estrutura pouco conhecida. Pela falta de um mecanismo excretório nas plantas, sugere-se que sua presença nas células possa ser resultante de um mecanismo de desintoxicação de substâncias fenólicas, que, por via metabólica, reagem entre si, formando lignina. Seu conteúdo nas paredes primárias é geralmente baixo. A lignificação é confinada a tecidos particulares, tais como elementos do xilema e floema e ocorre somente durante a formação da parede secundária. Ainda que ela se inicie desde a lamela média, espalha-se para as paredes primária e secundária, avançando até a membrana plasmática. Dessa maneira, todas as camadas ficam impregnadas por essa substância rígida, hidrofóbica e resistente à degradação. A lignificação parece ter dupla função: cimentar e ancorar as fibrilas de celulose e, por causa de sua dureza, impedir que a célula seja danificada.

Outros componentes da parede celular

Além dos compostos citados e que podem ser considerados majoritários nas paredes, outros componentes lipídicos, como as ceras, cutina e suberina, localizam-se nas paredes externas da maioria das células epidérmicas, ou células de revestimento. Cutina e suberina são formadas por vários ácidos graxos de cadeia longa, com apenas pequenas diferenças entre si. Elas formam a matriz, na qual as ceras, compostos lipídicos de constituição complexa, estão embebidas. A combinação cutina-cera forma a cutícula, que cobre as paredes externas das células epidérmicas. A suberina é o maior componente das paredes de algumas células, como das células de cortiça da batata ou de determinadas árvores. Geralmente, paredes suberinizadas mostram camadas alternadas de suberina e ceras. Essas camadas protetoras, duras e hidrofóbicas, disciplinam a evaporação de água e protegem as células contra lesões. As ceras, em particular, constituem a maior barreira contra a perda excessiva de água.

Ainda outros elementos das paredes celulares podem ser os minerais, como a sílica, comum nas paredes das gramíneas, e o carbonato de cálcio. Em algumas paredes também se detecta tanino, outra classe de polímeros fenólicos, que evita o ataque de vírus e fungos e repele os insetos.

Estrutura da parede celular

Com base no que se conhece sobre os componentes químicos da parede de células de plantas superiores, foi proposto um modelo estrutural, que parece ser válido para as paredes celulares primárias da maioria das espécies, incluindo muitas monocotiledôneas e todas as dicotiledôneas (Figura 13.6). Segundo esse modelo, as microfibrilas de celulose estão completamente cobertas e interligadas com uma camada de hemiceluloses (xiloglicanos), de uma molécula de espessura, que se dispõem paralelamente às fibrilas de celulose e a elas se ligam por pontes de hidrogênio (embora alguns modelos sugiram também ligações covalentes entre esses polímeros). No lado oposto de cada cadeia de xiloglicano, impedida pelas ramificações de outros açúcares que contém, não há possibilidade de formação desse tipo de pontes. A rede de microfibrilas de celulose-xiloglicanos é então embebida por uma matriz complexa de polissacarídios pécticos e proteínas. Parte das moléculas de xiloglicanos está ligada por ligações glicosídicas a moléculas de pectinas neutras,

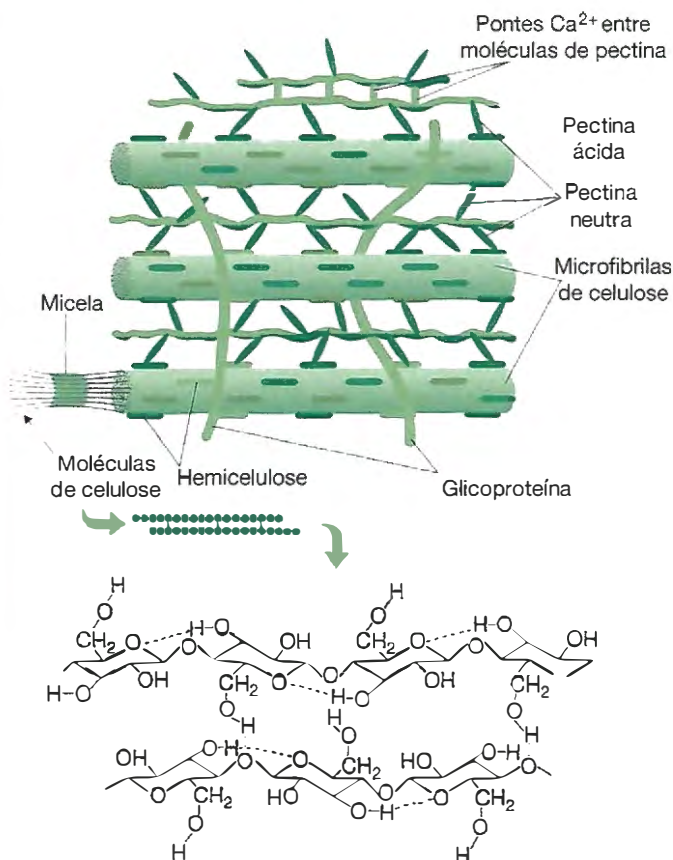



Figura 13.6 ▪ Modelo estrutural da parede celular primária mostrando interconexões entre seus principais componentes, que formam uma rede tridimensional hidrófila. As moléculas de celulose que compõem as microfibrilas estão intra e interligadas por pontes de hidrogênio, que conferem maior resistência à parede e, em alguns pontos, se arranjam em agregados cristalinos, denominados micelas, responsáveis pelas propriedades anisotrópicas da parede.

dispostas radialmente em relação ao eixo das fibrilas de celulose. As extremidades dessas moléculas, por sua vez, estão unidas por ligações glicosídicas a muitos resíduos de ramnose dos ramnogalacturonanos (pectinas ácidas). Também se formam uniões covalentes proteína-polissacarídio. Estas se estabelecem entre resíduos de hidroxiprolina (e de serina) das proteínas e resíduos específicos de açúcares (tetra-arabinoses, em geral) das pectinas neutras, que, por sua vez, se ligam covalentemente às pectinas ácidas. Como já mencionado anteriormente, nas paredes de gramíneas e monocotiledôneas relacionadas, as principais hemiceluloses que se interligam com as microfibrilas de celulose são glicuronoarabinoxilanos, mas também podem ser glicomananos ou outros glicanos específicos.

A orientação das microfibrilas de celulose que se depositam nas paredes primárias em crescimento segue diferentes padrões, dependendo do tipo celular, e esse padrão se altera mesmo depois das microfibrilas terem sido depositadas. Sabe-se, no entanto, que elas são organizadas seguindo a mesma orientação dos microtúbulos localizados logo abaixo da membrana plasmática. Assim, aquelas microfibrilas mais próximas da membrana plasmática têm orientação predominantemente transversal em relação ao eixo maior da célula, formando uma espécie de rede de malha frouxa, de modo a permitir o crescimento celular no sentido longitudinal. Conforme a célula cresce, mais material é depositado na superfície dessa rede, com a orientação das microfibrilas mais velhas assumindo um arranjo mais longitudinal e tornando-se mais paralelas, em resposta ao estiramento da parede. Esse é o caso de células do caule, em que as microfibrilas são orientadas principalmente em sentido perpendicular à direção de expansão da célula. Essas células podem, então, atingir 20 vezes seu comprimento original, com pouco crescimento em largura. Em comparação, em células de tecidos de armazenamento e células em cultura, as microfibrilas são depositadas ao acaso, permitindo que o crescimento seja mais ou menos uniforme em todas as direções.

Quanto à estrutura da parede secundária, nela as fibrilas de celulose assumem um arranjo complexo e ainda não bem elucidado. Nas células adultas, a parede secundária tem uma ou mais camadas muito rígidas, denominadas camadas *S1*, *S2* e *S3*, para caracterizar, respectivamente, as camadas externa, mediana e interna, que se organizam sequencialmente a partir da parede primária em direção à membrana plasmática (Figura 13.7). As camadas são diferenciadas em função da orientação particular das microfibrilas de celulose, como ilustrado na Figura 13.8. Geralmente, em cada

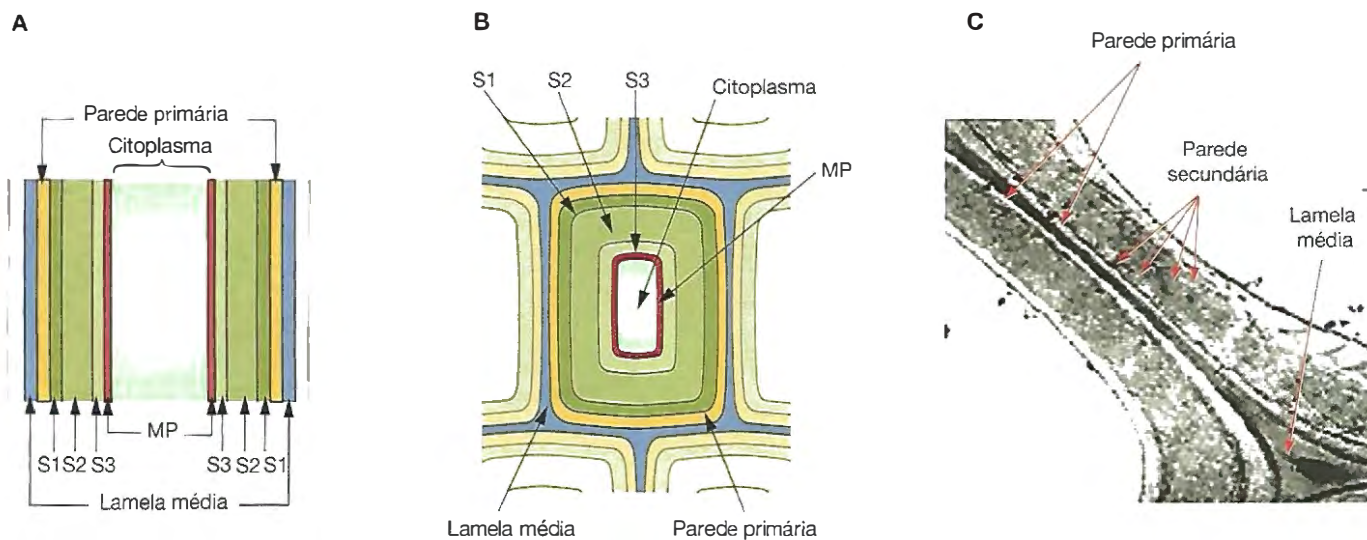



Figura 13.7 ▪ Disposição das camadas da parede celular em relação ao citoplasma e à membrana plasmática (MP) de uma célula vegetal, em corte longitudinal, no esquema (A) e na eletromicrografia (C) e em corte transversal (B).

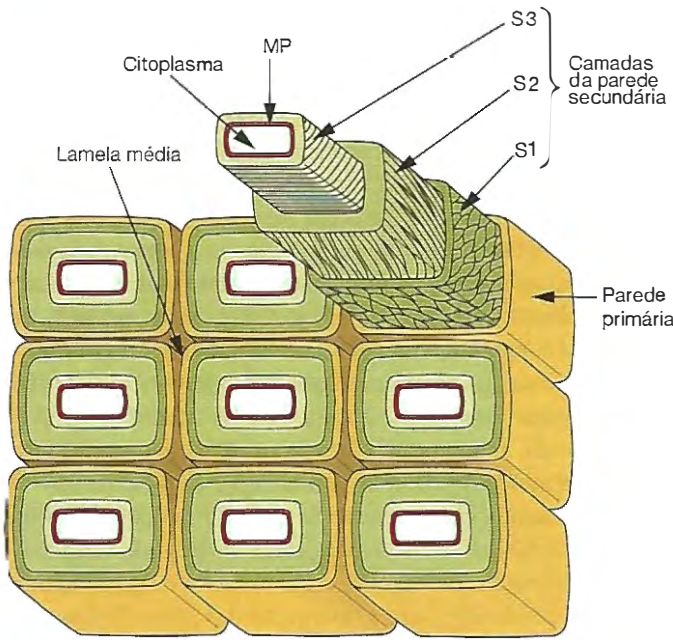



Figura 13.8 ▪ Diferentes orientações das microfibrilas de celulose nas três camadas da parede celular secundária (S1, S2 e S3).

camada, as microfibrilas têm um arranjo paralelo entre si, mas podem ser dispostas de três formas, em relação ao eixo da célula: fibrosa, helicoidal e anular. A fibrosa é aquela disposição em que as fibrilas estão paralelas ao eixo principal da célula; é pouco comum, mas encontra-se em fibras de interesse comercial, como cânhamo e linho. Na segunda, as fibrilas estão dispostas helicoidalmente, e, em alguns casos, com esse arranjo helicoidal, podem se dispor em sentidos opostos, de uma camada à seguinte; essa disposição leva à maior rigidez da estrutura e pode ocorrer, por exemplo, em células do esclerênquima, que é o principal tecido de sustentação vegetal. Na disposição anular, mais comum em vasos e traqueídeos, as fibrilas formam ângulos retos com o eixo longitudinal da célula.

■ Origem e crescimento da parede celular

Como já explicado anteriormente no Capítulo 9, a parede das células vegetais se origina durante a citocinese, ao final da divisão celular. Todos os precursores necessários para sintetizar os polissacarídios da parede celular vêm do citosol. Unidades do complexo de Golgi, denominadas dictiossomos, têm um importante papel nesse processo. Com exceção da celulose, os principais componentes da parede são sintetizados no complexo de Golgi e dele liberados na forma de vesículas. A formação da nova parede começa, logo após a migração dos cromossomos-filhos para os polos opostos da célula (Figura 13.9), pelo acúmulo das vesículas provenientes do complexo de Golgi na região do plano equatorial da célula em divisão. Essa localização das vesículas é controlada por uma faixa circular de microtúbulos que aparece no equador da célula durante a prófase inicial, chamada banda pré-profásica, que será explicada mais adiante, neste capítulo. As vesículas acumuladas entre os núcleos-filhos passam então por um ordenamento no plano equatorial da célula. Esse alinhamento é direcionado pelas fibras interzonais do fuso da divisão, compostas pelos microtúbulos que ainda se estendem entre os núcleos-filhos, antes de sua completa despolimerização. Essas regiões se caracterizam também pela presença de cisternas do retículo endoplasmático e muitos ribossomos. A esse arranjo estrutural ordenado de vesículas no plano equatorial da célula dá-se o nome de fragmoplasto (do grego, *phragma*, cerca). Em seguida, as vesículas dispostas lateralmente se fundem e as membranas que as revestem dão origem às membranas plasmáticas das duas células-filhas. Entre estas, permanece o material que estava contido nas vesículas, agora componente da parede que se forma. Essa fusão resulta em uma estrutura em forma de disco, chamada placa celular, que é a primeira manifestação visível da parede celular. A placa celular cresce no plano equatorial, até alcançar as paredes laterais já existentes, pela adição de mais vesículas. A manutenção das estruturas citoplasmáticas entre as vesículas que se fundem dá origem

A B C D

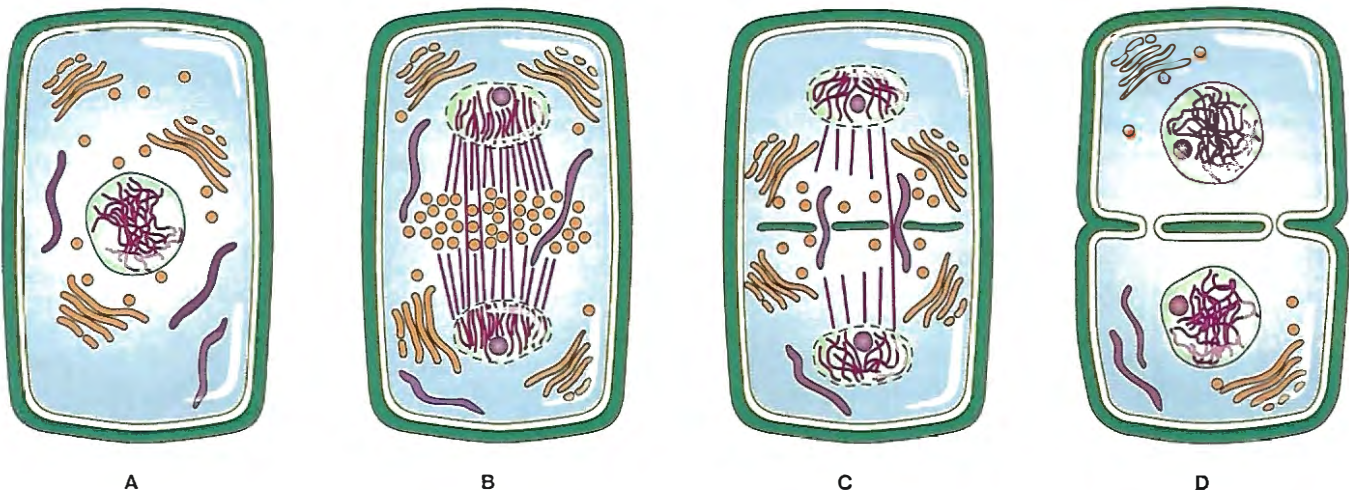



Figura 13.9 ▪ Esquema da origem da parede celular. **A.** Corte de célula em intérfase, limitada pela parede celular, com núcleo central e dictiossomos distribuídos pelo citoplasma. **B.** Célula em citocinese, mostrando os dois núcleos-filhos em reorganização e a formação do fragmoplasto. Na região equatorial da célula, as vesículas produzidas pelos dictiossomos se acumulam e, posteriormente, se alinham em associação às fibras interzonais do fuso e às cisternas do retículo endoplasmático – RE. **C.** A placa celular resulta da fusão das vesículas, entre as quais cisternas tubulares do RE ficam aprisionadas. **D.** A placa celular atinge as paredes laterais da célula-mãe, dando origem à membrana plasmática e à parede de cada célula-filha, onde se formam os plasmodesmos.

aos plasmodesmos, pequenos canais entre os citoplasmas das células-filhas. Uma vez completada a partição entre as duas células-filhas, já se detecta celulose em ambos os lados da placa celular, constituindo a parede celular primária.

▪ Biossíntese dos polissacarídios da parede celular

A biossíntese da celulose e dos polissacarídios não celulósicos, ou polissacarídios da matriz da parede celular, ocorre por vias muito distintas (Figura 13.10).

As hemiceluloses e pectinas, polissacarídios da matriz, são sintetizadas no complexo de Golgi, empacotadas e transportadas em vesículas até a membrana plasmática e liberadas por exocitose para a parede. Na parede celular se difundem por alguma distância, ajudadas pela pressão de turgor da célula e se tornam integradas à rede de componentes da parede por meio de interações físicas, ligações enzimáticas e ligações cruzadas. Para sua síntese, são necessários muitos precursores citosólicos, como açúcares ligados a nucleotídios, substratos das gligosiltransferases do Golgi, que estabelecem as ligações glicosídicas nas cadeias nascentes e S-adenosilmetionina e acetil-CoA, substratos para metilação e acetilação desses polímeros. Íons, tais como manganês, magnésio, cálcio e prótons, são também importantes cofatores para essa síntese. Assim, a adequada atividade de numerosos e diferentes transportadores de membrana para o interior das cisternas do complexo de Golgi é essencial para a correta biossíntese dos polissacarídios não celulósicos da parede.

Por sua vez, e de modo muito diferente, a síntese da celulose não é intracelular. A celulose e a calose são os únicos polissacarídios conhecidos polimerizados por grandes complexos enzimáticos localizados na membrana plasmática, respectivamente sintase de celulose e sintase de calose. A sintase de celulose, cuja sigla em inglês é CESA, está embebida na membrana plasmática de vegetais superiores em complexos transmembranosos hexaméricos de 25 a 30 nm de diâmetro, identificados ao microscópio eletrônico como partículas intramembranosas, conhecidos como complexos terminais ou como rosetas. Acredita-se que cada subunidade dessa roseta hexamérica seja constituída, por sua vez, por seis proteínas sintase de celulose, as quais são sintetizadas por, pelo menos, três distintos genes *CESA* relacionados. Assim, propõe-se que um complexo em roseta seja composto de um hexâmero de hexâmeros de CESA (Figura 13.11A). Segundo este modelo, cada proteína CESA, com seu sítio ativo voltado para o lado citosólico, sintetizaria uma única cadeia de D-glicose $\beta(1\rightarrow4)$,

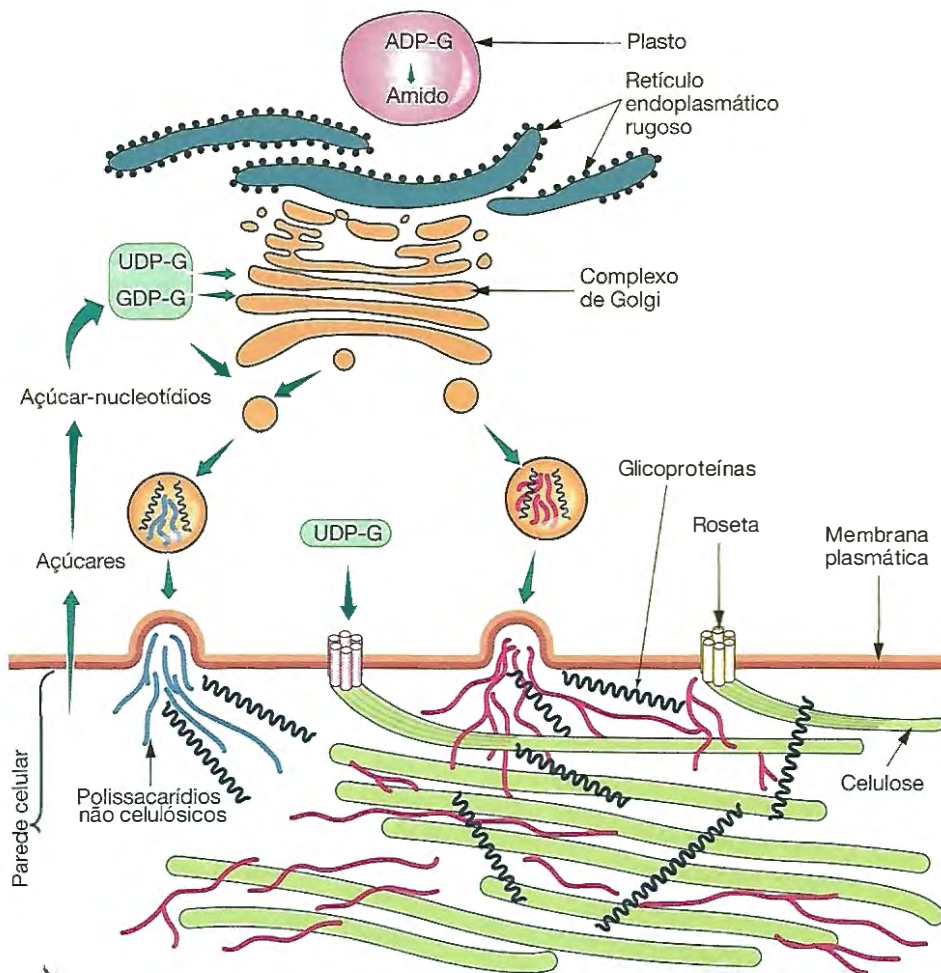



Figura 13.10 ▪ Biossíntese dos componentes da parede celular. Os polissacarídios não celulósicos são sintetizados no complexo de Golgi. As glicoproteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Ambos são transportados juntos, em vesículas, para a superfície celular, na qual se associam à celulose em formação. A síntese de microfibrilas de celulose se dá por um complexo enzimático de sintase de celulose, denominado roseta, localizado na membrana plasmática. A roseta se desloca, deixando para trás a fibrila de celulose, que se polimeriza no espaço extracelular. Acredita-se que a energia da polimerização conceda a força para este movimento. Os precursores UDP-glicose (UDP-G) e GDP-glicose (GDP-G) são fornecidos pelo citosol.

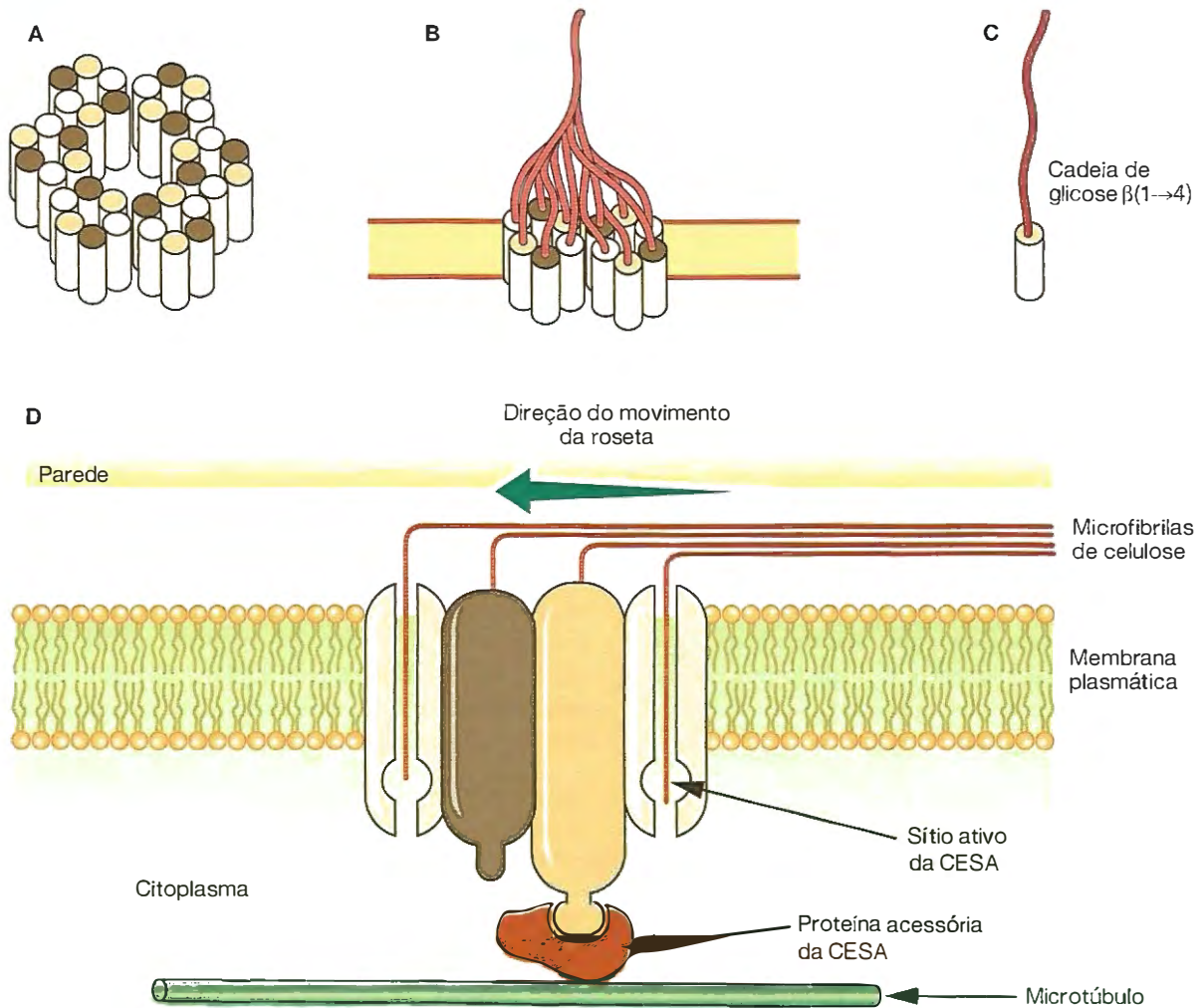



Figura 13.11 ▪ Modelo esquemático da síntese de celulose que ocorre na membrana plasmática. Modelo da roseta de sintase de celulose contendo 36 proteínas CESA, que seria responsável pela síntese de uma microfibrila de celulose, composta por 36 cadeias. **A.** Vista superficial do complexo hexamérico mostrando como três diferentes proteínas CESA estariam organizadas nas subunidades da roseta. **B.** Duas subunidades hexaméricas da roseta, mostrando como cada uma sintetizaria 6 cadeias de celulose. **C.** Proteína CESA sintetizando uma cadeia de glicose β(1→4). **D.** Modelo da roseta de sintase de celulose em corte transversal, a qual se move através da membrana plasmática em resposta à polimerização das cadeias de celulose, que ocorre por adição de monômeros de glicose a partir de UDP-glicose citoplasmático.

e cada uma das seis subunidades de uma roseta sintetizaria seis cadeias (Figura 13.11B e C). Estas se cocristalizam em uma microfibrila de celulose de 36 cadeias, e este complexo em roseta, provavelmente com ajuda de outras proteínas, parece estar envolvido simultaneamente com a polimerização da celulose em microfibrilas e com a cristalização das cadeias sintetizadas. Essas duas reações são catalisadas extracelularmente, uma vez que, por meio de um canal central de cada roseta, ocorre a extrusão das microfibrilas de celulose em crescimento para o espaço extracelular. Novas técnicas de observação direta das rosetas na membrana mostram que, para que haja este crescimento, os complexos em roseta se deslocam lentamente pela membrana, o que fazem a uma velocidade média de 300 nm/min, correspondente à adição de 300 a 1.000 unidades de glicose por minuto. O movimento da CESA parece ser dirigido pela própria polimerização das cadeias, mas a orientação da deposição das microfibrilas é guiada diretamente pelos microtúbulos (Figura 13.11D). A deposição de microfibrilas na orientação correta é essencial para direcionar o crescimento celular. Os complexos em roseta são montados no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, em que são inativos e, durante a síntese da celulose, movem-se, inseridos em vesículas também orientadas por microtúbulos, até a membrana plasmática, na qual se tornam ativos. A síntese das paredes celulares, primária e secundária, requer diferentes conjuntos de sintases de celulose nas rosetas funcionais. Por exemplo, em *Arabidopsis*, CESA1, 3 e 6 são usadas na formação da parede primária e CESA4, 7 e 8, da parede secundária.

▪ *Expansão da parede*

Depois que os polissacarídios da matriz da parede são secretados, eles se associam com as microfibrilas de celulose recentemente sintetizadas e com os polímeros preexistentes na parede e formam uma rede extensível. Dessa maneira, a espessura da parede aumenta. Por causa desse modo de crescimento da parede, ao final do processo de expansão e principalmente quando se forma uma parede secundária rígida, que não mais se expande, as células têm de reciclar o excesso de membrana plasmática que foi adicionada pela fusão continuada de novas vesículas provenientes dos dictiossomos. Aparentemente, para remover esse excesso, as células vegetais usam o mesmo

mecanismo usado pelas células animais: a endocitose; ou seja, porções da membrana plasmática tornam-se revestidas por uma estrutura proteica especial (clatrina) e formam vesículas cobertas, que se desprendem e penetram no citoplasma (Capítulo 10). O tempo de vida das rosetas foi estimado em somente 20 min, o que sugere que elas são dissociadas ou endocitadas.

O crescimento da parede depende não só da biossíntese de novos componentes, mas, sobretudo, do aumento do potencial de pressão intracelular (pressão de turgor), causado pela expansão dos vacúolos, conforme a célula absorve água. A pressão intracelular pressiona a membrana plasmática contra a parede celular, que gera a força para a expansão física da parede. No entanto, essa expansão só ocorre após o afrouxamento da parede, que é causado pelo hormônio auxina. A auxina é ativadora de uma bomba de prótons localizada na membrana plasmática. Quando os prótons são bombeados para fora, acidificam a parede celular, que chega a um pH entre 4,5 e 6,0, que lhe é típico, o qual estimula as expansinas, que promovem o rompimento das ligações não covalentes entre os polissacarídios da parede e dissocia a rede de polissacarídios que une as microfibrilas de celulose entre si, o que permite o alongamento do tecido. Portanto, a pressão de turgor proporciona o estiramento da parede, aumenta sua porosidade e fornece um gradiente de energia para dirigir os recém-sintetizados polissacarídios não celulósicos da matriz para dentro da parede.

As células vegetais também se interconectam e se comunicam como ocorre com as células animais

Nas plantas, a interação entre células vivas é feita, principalmente, por sinais químicos e por comunicações intercelulares, processadas por meio de canais cilíndricos que atravessam as paredes de células vizinhas, comunicando diretamente os seus citoplasmas. Essas conexões formam, assim, uma fase citoplasmática contínua denominada simplasto. Esses canais, chamados de plasmodesmos, têm um diâmetro de 20 a 60 nm e são gerados, pelo menos em sua maioria, no momento da formação da parede celular primária (Figura 13.9). Ao microscópio óptico são visíveis como linhas finas e, ao microscópio eletrônico, aparecem como canais estreitos delineados pela membrana plasmática e muitas vezes atravessados por uma estreita cisterna de retículo endoplasmático, conhecida como desmotúbulo, e por proteínas associadas (Figura 13.12). Apesar do seu diâmetro relativamente largo, os plasmodesmos têm a mesma permeabilidade apresentada pelas junções comunicantes (*gap-junctions*) das células animais, dificultando o trânsito intercelular de moléculas de peso acima de 800 dáltons. Além disso, o tamanho da abertura pode ser regulado por rearranjos das proteínas internas, permitindo, eventualmente, a passagem de moléculas maiores. Essa limitação permite que células vizinhas se diferenciem em tipos celulares distintos e mantenham concentrações internas próprias. Determinados vírus vegetais, porém, conseguem transpor essa barreira, transferindo-se através dos plasmodesmos às células vizinhas.

Os plasmodesmos são abundantes e podem ocorrer ao longo de toda a parede, mas, frequentemente, aparecem agregados em determinadas zonas, nas quais a parede primária é interrompida, ou particularmente fina e não recoberta pela parede secundária, constituindo os campos de pontoação primária, ou só pontoações primárias. Estes são abundantes em células condutoras e secretoras, como nas células glandulares de néctar ou de óleo. Quando se forma a parede secundária, esses contatos deveriam ficar ocluídos, mas nem sempre isso ocorre. As camadas da parede secundária se depositam ao redor da zona onde os plasmodesmos são muito numerosos, e não sobre ela. Nessas partes, a parede permanece delgada e a estrutura originada se denomina pontoação secundária, ou simplesmente pontoação. Quando a pontoação ocorre oposta a uma estrutura correspondente na célula contígua, constitui-se um par de pontoações ou pontoação bilateral. A cavidade formada pela interrupção da parede secundária é denominada de cavidade da pontoação, e a estrutura que se mantém separando um par de pontoações, formada pela lamela média mais as duas paredes primárias, é chamada de membrana da pon

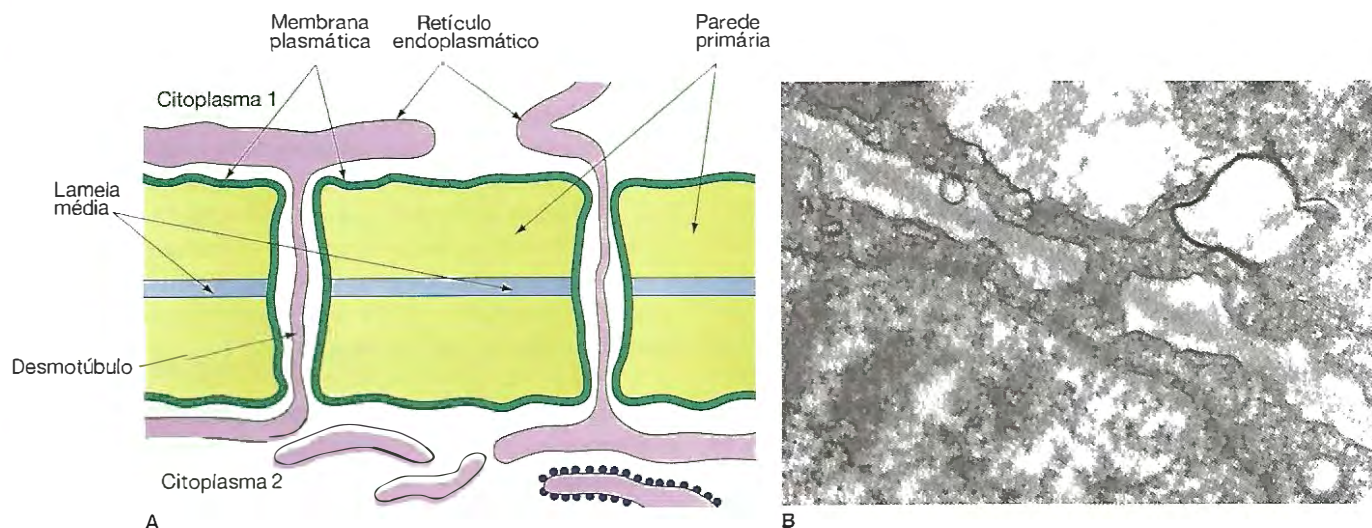



Figura 13.12 ■ Estrutura do plasmodesmo **A**. Esquema representativo de plasmodesmos entre duas células vizinhas. **B**. Eletromicrografia de antera de *Rhynchospora pubera*, mostrando plasmodesmos entre dois meócitos. 23 000×. (Cortesia de J. A. B. San Martin.)

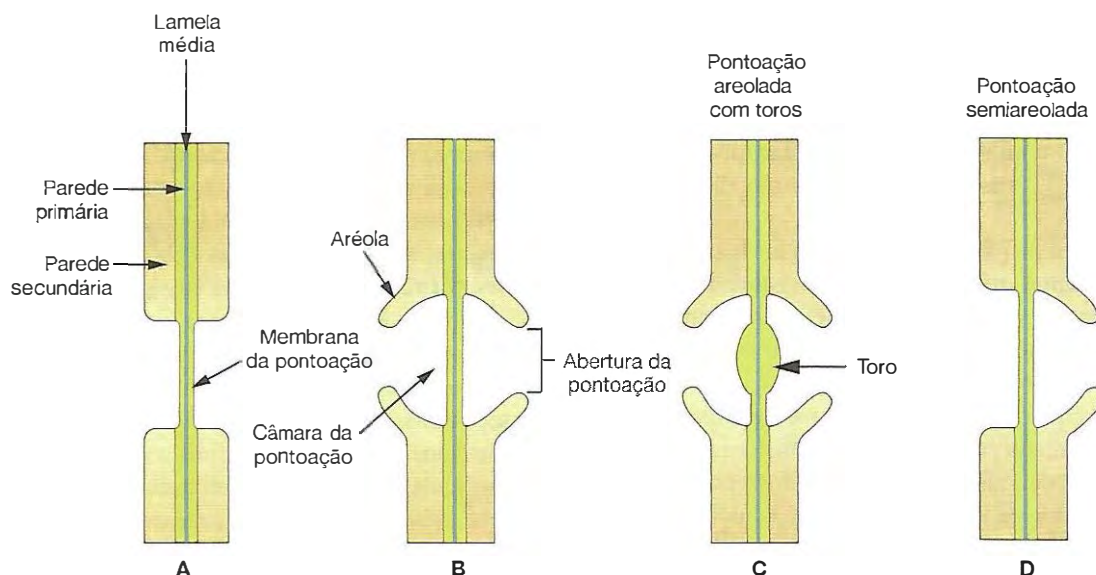



Figura 13.13 ▪ Esquemas representativos de tipos de pontoações. **A.** Par de pontoações simples. **B.** Par de pontoações areoladas. **C.** Pontoação areolada com toro. **D.** Pontoação semiareolada, em que a pontoação é simples de um lado e areolada do outro.

toação, que é atravessada por numerosos plasmodesmos. A Figura 13.13 ilustra os tipos de pontoação existentes: a simples e a areolada. A simples (Figura 13.13A) é aquela que se forma apenas pela interrupção da parede secundária sobre a zona onde havia originalmente o campo de pontoação. As areoladas (Figura 13.13B) se caracterizam por uma deposição arqueada da parede secundária, sobre a cavidade da pontoação, que não chega a fechá-la completamente, deixando um poro estreito no centro. Este tipo é encontrado em células do xilema. Às vezes, como nas coníferas, a membrana da pontoação areolada apresenta um espessamento na parte central, o qual recebe o nome de toro e é formado por microfibrilas de celulose dispostas de forma circular e uma zona marginal mais delgada, com microfibrilas radiais. A membrana da pontoação geralmente é flexível e, sob determinadas condições, o toro pode ser deslocado do centro da pontoação e apoiado contra uma das aberturas, dificultando a passagem de água entre as células vizinhas (Figura 13.13C). Uma mesma célula pode apresentar mais de um tipo de pontoação. Se, por exemplo, um elemento de vaso é contíguo a outro elemento de vaso, apresenta um par de pontoações, mas, se é contíguo a uma célula de parênquima, irá apresentar um par de pontoações semiareoladas (Figura 13.13D).

As células vegetais têm vacúolos com características próprias, diferentes dos pequenos vacúolos das células animais

Além do cloroplasto, a organela mais evidente na célula vegetal é o vacúolo, estrutura que chega a ocupar 95% do volume celular (Figuras 13.1 e 13.2). O vacúolo é cheio de fluido, chamado de suco celular, e apresenta uma membrana que o reveste, que recebe o nome específico de tonoplasto. Seu pH é geralmente ácido, pela atividade de uma bomba de prótons presente no tonoplasto.

A célula vegetal imatura, do meristema, contém vacúolos pequenos e numerosos, chamados provacúolos, formados pela rede *trans* do Golgi, que, nas células vegetais, é disperso no citoplasma como dictiossomos. À medida que a célula cresce, eles se fundem e aumentam de tamanho, enquanto o tonoplasto também incorpora novas vesículas derivadas do Golgi, até formar um único vacúolo. Grande parte da expansão celular resulta da absorção de água pelo vacúolo, o que faz com que o citoplasma fique restrito a uma fina camada junto à membrana plasmática, que é empurrada contra a parede celular. Preencher grande parte de seu conteúdo total com um vacúolo é uma estratégia econômica usada pela célula para aumentar seu tamanho e adquirir grande superfície de contato entre o citoplasma e o ambiente externo, sem gasto de energia.

A maioria das plantas é rodeada por um ambiente hipotônico, e, consequentemente, as células absorvem muita água. Vacúolos preenchidos com água mantêm uma forte pressão hidrostática interna, chamada de pressão de turgor, que empurra a membrana plasmática contra a parede celular rígida, mantendo as células túrgidas. Por isso, os vacúolos são estruturas que participam da manutenção do turgor celular e da rigidez dos tecidos. Quando há perda de água, a planta murcha, por diminuição do turgor intracelular. Se a perda de turgor persiste, a membrana plasmática se retrai em um processo denominado plasmólise. Em muitas células, mesmo frente a grandes mudanças na tonicidade do fluido extracelular, a pressão de turgor é mantida praticamente constante, graças ao processo controlado de quebra e ressíntese de polímeros no vacúolo e ao controle de fluxo de açúcares, aminoácidos, íons e outros metabólitos por meio da membrana plasmática e do tonoplasto.

Os vacúolos são organelas muito versáteis, uma vez que desempenham numerosas funções; além de acumularem nutrientes, metabólitos e catabólitos, servem de depósito de substâncias específicas como açúcares, proteínas, ópio, látex e, também, de várias substâncias venenosas ou de gosto desagradável, que protegem a planta contra seus predadores (insetos e animais herbívoros).

A diversidade de funções dos vacúolos é indicada pela variedade de substâncias que contêm. Além de água, seu conteúdo varia com o tipo de planta e seu estado fisiológico. Ocorre também que diferentes vacúolos, com funções distintas, podem estar presentes na mesma célula. Geralmente, seus componentes são íons, sais, açúcares, hormônios de crescimento, pigmentos solúveis em água, enzimas hidrolíticas e outras proteínas dissolvidas. Neles ocorre a estocagem de vários produtos de metabolismo, conhecidos como substâncias ergásticas, entre os quais alguns são produtos de armazenamento e outros produtos de descarte. Frequentemente, esses produtos estocados têm função metabólica. As proteínas de reserva armazenadas nas sementes, por exemplo, são hidrolisadas quando a semente germina, e os aminoácidos mobilizados servem de nutrientes para o desenvolvimento do embrião. Os vacúolos também são compartimentos importantes para isolar produtos tóxicos resultantes do metabolismo, como alguns alcaloides (p. ex., nicotina) e derivados fenólicos (p. ex., tanino). Algumas vezes, a concentração de um determinado soluto no interior dos vacúolos é tão elevada que favorece a formação de cristais. Drusas, estiloides, prismáticos e ráfides são cristais de oxalato de cálcio, resultantes do acúmulo de ácido oxálico, que, ao se combinar com moléculas de água, assume formas diversas e comumente encontradas em vários órgãos dos vegetais. Nos vacúolos ainda ocorre o depósito de pigmentos, principalmente daqueles que constituem um grupo diferente de outros pigmentos celulares, por serem muito hidrossolúveis. Este é o grupo das antocianinas, responsáveis pelas cores azul, violeta, púrpura, vermelho-escuro e escarlate de folhas, frutos e flores de uma infinidade de vegetais. Às vezes, as antocianinas mascaram a cor verde da clorofila das folhas, seja por sua grande intensidade, seja pelo aumento temporário na sua síntese, como acontece durante o outono, em muitas plantas. Vacúolos têm também função de digestão; por isso, são relacionados e comparáveis aos lisossomos presentes nas células animais, uma vez que as enzimas vacuolares são responsáveis pela degradação de macromoléculas e pela reciclagem dos constituintes celulares, inclusive de organelas inteiras. Finalmente, os vacúolos podem estocar íons como prótons, potássio e cloreto, que ficam, assim, facilmente recuperáveis pelo hialoplasma, quando necessários para o metabolismo celular. Em plantas de ambientes salinos, o vacúolo é especializado em armazenar grandes concentrações de cloretos, protegendo o citoplasma da toxicidade do sal. Também no caso de uma diminuição do pH do ambiente, o fluxo de íons H^+ para o meio intracelular é parcialmente balanceado pelo aumento de transporte desses íons para o interior do vacúolo, mantendo constante o pH citosólico. Assim, o vacúolo se constitui em um importante recurso homeostático, capacitando as células vegetais a suportar grandes variações ambientais.

Citoesqueleto: importância nas atividades das células vegetais

Como todas as células eucarióticas, as células vegetais têm também um citoesqueleto que se estende por todo o hialoplasma e está intimamente relacionado com diversos processos, como divisão celular, crescimento e diferenciação, deposição da parede, manutenção da forma, além de movimentos celulares. Três tipos de elementos do citoesqueleto estão presentes nas células vegetais: filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários.

Muitos papéis são atribuídos aos filamentos de actina, muitas vezes associados aos microtúbulos, entre eles a deposição da parede celular, o crescimento da ponta do tubo polínico, a migração cromossômica na divisão celular e a corrente citoplasmática. Este último assume características particulares nas células vegetais.

Em razão do grande vacúolo central, que comprime os constituintes celulares contra a parede, as células vegetais têm um sistema de transporte intracelular próprio. Pelo fato de serem essas células muito mais longas do que as células animais (frequentemente atingem mais de 100 mm e podem alcançar até alguns milímetros), esse transporte é dificultado. Entretanto, em células vivas observadas ao microscópio de luz, os movimentos do citoplasma são constantes. Organelas e partículas participam de uma corrente citoplasmática, denominada de ciclose, uma vez que o movimento é circular em torno do vacúolo central. O movimento se baseia na interação de filamentos de actina com miosina. Nas células vegetais, a região mais externa do citoplasma é relativamente imóvel, enquanto a parte mais interna é mais fluida. Filamentos de actina se enfileiram entre essas duas regiões, e, ao deslizarem entre si, promovem a corrente tanto na camada periférica do citoplasma como em canais citoplasmáticos, contínuos a essa camada. A ciclose aumenta a troca de materiais entre organelas, entre membrana e organelas e entre células. Além disso, verifica-se que, graças à ciclose, as células vegetais são capazes de aproveitar melhor a quantidade de luz que recebem, espalhando os seus cloroplastos uniformemente no citoplasma, quando há pouca luz, agrupando-os, quando há excesso de luz, ou então orientando-os obliquamente, como lâminas de uma veneziana.

Os microtúbulos, em razão de sua capacidade de adquirir arranjos espaciais particulares, participam de várias atividades essenciais das células vegetais. A sua organização em arranjos radiais, que são nucleados por estruturas citoplasmáticas complexas como centrossomos ou corpos do polo do fuso, é bem conhecida e estudada em células animais. Já arranjos não centrossômicos de microtúbulos, com diversas arquiteturas, ocorrem em todas as plantas superiores, em células interfásicas com diferentes formas e funções. Como foi anteriormente mencionado, em células interfásicas que estão crescendo rapidamente, tais como as encontradas na epiderme da zona de crescimento da raiz, os microtúbulos se localizam subjacentes à membrana plasmática (daí chamados de microtúbulos corticais), dispostos coalinhadamente, paralelos entre si, em arranjos transversais ao eixo principal de crescimento da célula, e orientados paralelamente à primeira camada de fibrilas de celulose da parede celular. Essa disposição determina, por sua vez, que a direção da expansão celular se dê em ângulo reto à orientação tanto das microfibrilas como dos microtúbulos. No entanto, os arranjos de microtúbulos corticais não são estáticos, mas muito dinâmicos, passando por mudanças de organização de maneira surpreendentemente rápida em alguns casos. Essas mudanças são associadas à regulação do crescimento celular. Conforme as células passam a crescer vagarosamente e param, a orientação dos microtúbulos transforma-se

em oblíqua e eventualmente longitudinal ao eixo das células. Em razão do crescimento celular, quando há necessidade de mudar a orientação das fibrilas, observa-se, antes, um rearranjo correspondente nos microtúbulos. Quando os microtúbulos corticais são despolimerizados, com o uso, por exemplo, da orizalina, a produção de celulose não é inibida, mas a célula fica impossibilitada de organizar as fibrilas que se formam. Os microtúbulos, portanto, não participam da síntese de celulose, mas, sim, da orientação de suas moléculas. Os microtúbulos atuam também no alongamento dos tubos polínicos, que ocorre na reprodução das plantas, quando se dispõem paralelamente ao eixo maior desses tubos, orientando a direção de seu crescimento. Em células que estão se diferenciando em elementos vasculares, microtúbulos corticais se agrupam em superfeixes que correspondem aos locais dos espessamentos das paredes transversais que caracterizam essas células. Já nas células maduras, os microtúbulos são encontrados em feixes paralelos densamente empacotados, que não mostram orientação clara com o eixo de crescimento da célula. Essa organização agrupada dos microtúbulos provavelmente dá origem à organização em multicamadas das microfibrilas de celulose na parede celular. Imediatamente antes da prófase, um grupo de microtúbulos se dispõe em torno do núcleo, formando um anel chamado banda pré-profásica, que permanece até a metáfase e que, em muitas células, é composta também por filamentos de actina. Essa banda é que define o plano equatorial, que se estabelece com a disposição dos microtúbulos do fuso mitótico. No final da divisão, os microtúbulos participam da organização do fragmoplasto e do desenvolvimento da placa equatorial. Eles direcionam o movimento do material vesicular para a formação da nova parede, após a divisão celular. Além de participarem dos movimentos intracelulares, os microtúbulos são os responsáveis pelo batimento de cílios e flagelos, que ocorre principalmente nos animais, nos quais são frequentes os exemplos de células inteiras móveis. Nos vegetais, as únicas células móveis, capazes de nadar, são as células espermáticas de algumas plantas. Essas células podem ter de dois a milhares de flagelos, que têm a mesma estrutura e igual mecanismo de ação que os flagelos conhecidos nos demais eucariontes.

Filamentos intermediários de plantas são menos conhecidos que os de células animais, mas parecem ser tão diversos como aqueles e fornecer rigidez estrutural à célula, como nos animais. Em tabaco, filamentos intermediários conectam a superfície do núcleo à periferia da célula e envolvem os pólos do fuso. Em outras plantas, filamentos de queratina, que são encontrados nos epitélios animais, têm sido identificados em folhas e cotilédones. Filamentos intermediários semelhantes às laminas, componentes da lâmina nuclear, estão também presentes em núcleos de células de plantas, mas não se sabe ainda se são compostos pelas mesmas proteínas animais.

Os plastos, dos quais os mais importantes são os cloroplastos, são estruturas características das células vegetais

Os plastídeos ou plastos constituem um grupo de organelas específicas das células vegetais que contêm membrana dupla e um genoma próprio, características que têm em comum com as mitocôndrias. É provável que também tenham tido origem a partir de células procariontes que se tornaram endossimbiontes, como ocorreu com as mitocôndrias. Diferentes tipos de plastos são classificados em termos de cor e função. Se contêm pigmentos, são denominados cromoplastos (do grego *chroma*, cor) e, se incolores, sem pigmentos, recebem o nome de leucoplastos (do grego *leukós*, sem cor). Os pigmentos armazenados em cromoplastos são do tipo carotenoide, diferenciando-se dos pigmentos do tipo flavonoide, armazenados em alguns vacúolos. O nome cromoplasto é genericamente dado às organelas cujos pigmentos são não fotossintéticos, ao passo que, se os cromoplastos têm clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, recebem especificamente o nome de cloroplastos. (*Pigmento é qualquer composto químico que absorve luz, e, quando isso é feito, seus elétrons podem se elevar a um nível energético mais alto, tornando-se uma molécula excitada. A energia que é liberada na excitação pode ser capturada em uma ligação química, no processo denominado de fotossíntese.*)

Os cloroplastos, contendo predominantemente clorofilas (*khlórós*, verde), ocorrem em algas verdes e nas partes aéreas verdes das plantas, sendo mais diferenciados nas folhas. Como local da fotossíntese, eles têm importância fundamental na economia da célula vegetal; permitem que elas sejam capazes de, na presença de luz, remover carbono do dióxido de carbono do ar e incorporá-lo em suas próprias substâncias, liberando oxigênio da célula, concomitantemente.

Os pigmentos carotenoides, lipossolúveis e presentes em altas proporções nos outros tipos de cromoplastos, são responsáveis pela coloração amarela, alaranjada ou vermelha de flores, alguns frutos e raízes e de algumas folhas. Nas folhas verdes, a cor dos carotenoides é mascarada pelas clorofilas que se encontram em maior quantidade. Os cromoplastos recebem nomes específicos de xantoplastos, quando o pigmento predominante é a xantofila (*xantós*, amarelo) ou eritroplastos, quando neles predomina eritrofila (*erithrós*, vermelho). Os cromoplastos podem desenvolver-se a partir de cloroplastos preexistentes, como ocorre durante o amadurecimento de muitos frutos, em razão de uma transformação gradual que envolve a degradação da clorofila e das membranas internas e o acúmulo de grandes quantidades de carotenoides. Suas cores atraem insetos e outros animais com os quais coevoluíram, tendo, assim, um papel essencial na polinização das flores e na dispersão de frutos e sementes.

Os leucoplastos sintetizam e acumulam substâncias de reserva e compreendem três tipos: os amiloplastos, os mais importantes, que sintetizam e armazenam grandes grãos de amido, presentes, por exemplo, em tubérculos de batata inglesa; os proteinoplastos ou proteoplastos, que armazenam proteínas, como ocorre nas sementes de feijão, por exemplo; e os elaioplastos ou oleoplastos, que acumulam lipídios ou gorduras e ocorrem, por exemplo, no abacate. Os amiloplastos, diferentemente dos cloroplastos, que têm pequenos grãos de amido, contêm um ou mais grãos de amido que podem distender e, até mesmo, romper a dupla membrana da organela. Cada grão de amido é envolto por uma membrana que se desenvolve a partir da membrana interna do envelope do plastídeo, a qual, por sua vez, é rodeada pelo próprio envelope. Se expostos à luz, os amiloplastos podem se transformar em

cloroplastos, como acontece com a batata, que, após alguns dias de luminosidade, vai adquirindo cor verde à medida que os amiloplastos passam por modificações estruturais. Amiloplastos especializados ocorrem nas células da coifa, onde servem como sensores da gravidade e dirigem o crescimento da raiz em direção ao solo. Dos proteoplastos pouco se conhece, exceto que contêm poucas membranas internas e que, neles, a proteína se encontra em uma forma cristalina. Os elaioplastos têm grandes quantidades de óleos na forma de gotas e podem ser originados a partir de cloroplastos, pelo menos em algumas espécies.

Todos os tipos de plastos parecem relacionados. Em muitos casos pode ocorrer a transformação de um tipo em outro e, em qualquer caso, todos são derivados de plastídeos muito pequenos, indiferenciados e incolores, denominados de proplastos ou proplastídios, presentes nas células meristemáticas, na oosfera e no saco embrionário. A Figura 13.14 representa a diferenciação de plastos, a partir do proplasto precursor, em plantas cultivadas na presença e na ausência de luz. A conversão de um tipo de plastídeo em outro é um processo muito frequente.

Nas células meristemáticas, a divisão de proplastos acompanha o processo de divisão celular, enquanto nas células diferenciadas, novos plastos também podem surgir de plastos funcionais preexistentes, que se dividem por processo de fissão binária, à semelhança das bactérias. Durante a reprodução sexual, geralmente o gameta feminino é o que transmite plastos diferenciados ou proplastos à geração seguinte. Em determinadas algas, por exemplo, os cloroplastos do gameta masculino degeneram depois da fecundação. Já na maioria dos vegetais superiores, os gametas masculinos (grãos de pólen) não contêm plastos, cloroplastos ou proplastos. Portanto, as características genéticas contidas no genoma plastidial são transmitidas apenas pelo gameta feminino, ao que se denomina herança citoplasmática materna.

A origem evolutiva dos cloroplastos e das mitocôndrias parece ter ocorrido por eventos simbióticos independentes

Admite-se que, com a evolução da vida anaeróbia existente inicialmente neste planeta, tenha se exaurido a fonte preexistente de compostos orgânicos produzidos por processo geoquímico pré-biótico (Capítulo 1). Surgiu, então, uma célula

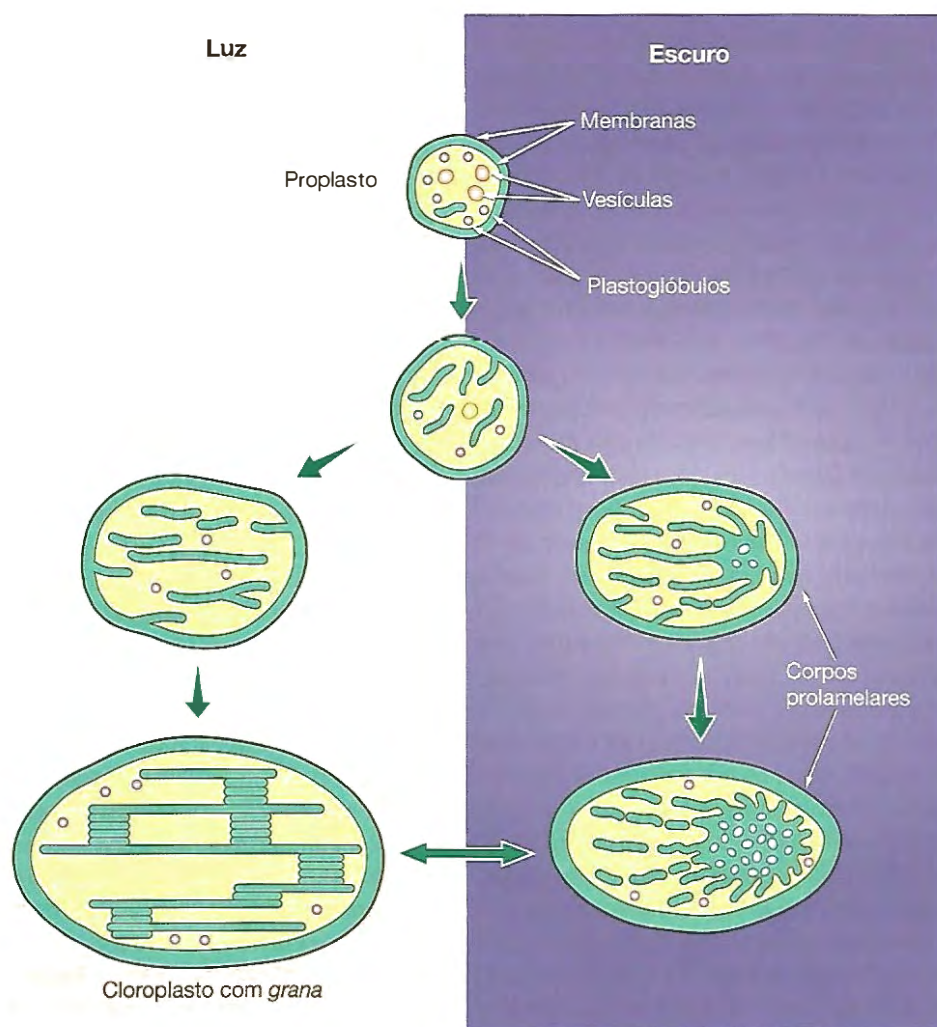



Figura 13.14 ▪ Desenvolvimento de plastídeos na presença e na ausência de luz. Proplasto é um plastídeo indiferenciado precursor dos outros plastídeos. Se o seu desenvolvimento ocorre ou é interrompido pela ausência de luz, formam-se estruturas internas com membranas tubulares, chamadas corpos prolamelares. Os plastos que os contêm são denominados de estioplastos. Se expostos à luz, podem se diferenciar em cloroplastos.

procarionte (bactéria), que desenvolveu mecanismos para captar a energia solar e utilizá-la para sintetizar compostos orgânicos, via geração de elétrons ricos em energia, derivados da decomposição da água. Nessa decomposição, formam-se elétrons, prótons e oxigênio. Iniciou-se assim, graças a esses organismos fotossintéticos, a vida aeróbia na Terra, pois, antes do aparecimento das bactérias autotróficas fotossintéticas, não existia oxigênio na atmosfera. Houve, então, uma mudança profunda nas condições da superfície da Terra, pela presença de oxigênio na atmosfera e consequente geração da camada de ozônio (protetora contra a radiação ultravioleta), criando-se condições mais favoráveis para a evolução. Eventos sucessivos de fagocitose entre bactérias primitivas, as quais, por motivos desconhecidos, acabaram não sendo digeridas por seus predadores e permaneceram no seu interior tanto usufruindo como oferecendo vantagens a eles, teriam levado ao surgimento das células eucariontes. Esta é a proposta da teoria endossimbiótica (endossimbiose, de *endo* = interna + *simbiose* = relação ecológica em que ambos os parceiros ganham).

A mesma hipótese simbiótica admite que os cloroplastos tenham se originado, nas células eucariontes, de organismos procariontes fotossintéticos (algas azuis, ancestrais das cianobactérias), que se instalaram em células primitivas aeróbicas eucariontes, criando uma situação mutuamente benéfica. De maneira semelhante, o metabolismo aeróbico desse hospedeiro, que provavelmente era incapaz de usar oxigênio, teria sido adquirido de precursores mitocondriais. Essa simbiose, ao que se presume ocorrida há cerca de 1,2 bilhão de anos, teria dado origem às algas vermelhas, depois às algas pardas e verdes e aos vegetais superiores. Durante o processo evolutivo, as bactérias precursoras dos cloroplastos, como as precursoras das mitocôndrias, transferiram parte do seu genoma para o DNA da célula hospedeira e passaram a depender do genoma da célula hospedeira para a síntese de muitas de suas proteínas.

Essa origem endossimbiótica comum das duas organelas das células eucariontes explicaria as semelhanças encontradas entre elas e delas com as atuais *Riquétsias* – grupo de bactérias parasitas intracelulares associadas a doenças como o tifo. Cloroplastos e mitocôndrias são similares em vários aspectos. Por exemplo, ambas as organelas contêm dupla membrana e parte da membrana interna dobrada e empilhada, formando compartimentos. As duas organelas produzem a maioria do ATP necessário para o metabolismo celular, por meio de um mesmo mecanismo: a enzima ATP-sintase, que está presente em suas membranas internas e usa a energia eletroquímica de prótons para fosforilar ADP em ATP. Cloroplastos e mitocôndrias também contêm DNA, que é circular e codifica parte de suas proteínas, contêm ribossomos menores do que os originados no nucléolo e, por último, são organelas semiautônomas, crescendo e dividindo-se por si mesmas nas células. Mas também apresentam diferenças entre si, entre as quais o tamanho geralmente maior dos cloroplastos em relação ao de mitocôndrias e, principalmente, a fonte de energia que utilizam para produzir ATP. Enquanto as mitocôndrias usam a energia de ligações químicas, cloroplastos usam a energia da luz solar, o que requer um conjunto de enzimas distinto em cada uma delas.

Estrutura e composição química dos cloroplastos

Os cloroplastos apresentam estruturas membranosas contendo clorofila e outros pigmentos.

Os cloroplastos são as maiores e mais evidentes organelas citoplasmáticas presentes nas células vegetais. Eles têm forma, número e posição muito diversos. Podem variar de um único cloroplasto em espiral, que confere à alga *Spirogyra* seu nome, até múltiplos orgânulos elípticos, ou biconvexos, típicos de células vegetais superiores (Figuras 13.2 e 13.12). Nessas células, apresentam um tamanho relativamente grande, de cerca de 5 a 10 mm de diâmetro e de 2 a 4 mm de espessura. Na maioria das células que realizam fotossíntese, ocorrem de 40 a 200 cloroplastos por célula, os quais se movimentam em função da intensidade de luz incidente e com a corrente citoplasmática.

Assim como as mitocôndrias, os cloroplastos, e os demais plastos, contêm três conjuntos distintos de membranas: a membrana externa, a interna e as membranas do tilacoide, o que cria três compartimentos solúveis separados: espaço intermembranoso, estroma e luz intratilacoide. As duas membranas que envolvem os cloroplastos têm, cada uma delas, aproximadamente 6,0 nm de espessura e estrutura molecular típica de *unidade de membrana*. Entre elas fica o espaço intermembranoso. A membrana externa contém porinas, proteínas que formam canais à semelhança dos existentes tanto na membrana mitocondrial externa como na membrana das bactérias. As porinas garantem que essa membrana seja livremente permeável a pequenas moléculas (com massa inferior a 13.000 dáltons). Ao contrário, a membrana interna do cloroplasto é impermeável a íons e metabólitos, os quais necessitam de transportadores específicos de membrana para serem translocados. Um dos transportadores mais conhecido é o que permite a entrada de fosfato inorgânico (Pi) com simultânea exportação para o citosol de trioses-fosfato produzidas pela fotossíntese. O Pi que entra no cloroplasto é usado na síntese de ATP. Na falta de Pi, as trioses-fosfato não podem ser transferidas para o citosol, o que promove a síntese de amido dentro do cloroplasto, podendo ocorrer inibição total do processo de fotossíntese. A membrana interna do cloroplasto, por falta de translocadores específicos, é impermeável ao NADPH e ao ATP sintetizados no interior da organela. Mas, como os principais produtos da fotossíntese (trioses-fosfato) são transportados para o citosol sob a forma fosforilada, ao serem metabolizados via glicólise, eles garantem a formação de NADH e de ATP citoplasmático. Grandes moléculas, como as proteínas dos cloroplastos que são codificadas pelo genoma nuclear e sintetizadas no citosol, devem ser também translocadas para os diferentes compartimentos da organela. O transporte da maioria delas é feito pós-traducionalmente por dois conjuntos de translocadores de membranas: Toc (do inglês *translocator of the outer chloroplast membrane*) e Tic (*translocator of the inner chloroplast membrane*), presentes nas membranas externa e interna, respectivamente. Cada conjunto é constituído por múltiplas proteínas, tanto ligadas à membrana como solúveis, que recebem nomes relacionados com sua massa molecular. Por exemplo, Toc75, junto com Toc33/34 e Toc195, constituem o núcleo do principal poro translocador da membrana externa, enquanto

outros componentes têm papéis coadjuvantes, como Toc64, que reconhece a proteína a ser translocada e a leva até o poro do Toc. Na membrana interna, o núcleo do poro translocador é constituído por Tic20, Tic22 e Tic110. Destes, Tic22 está na forma solúvel no espaço intermembranoso e é o primeiro componente do Tic a interagir com a proteína a ser importada. No lado oposto, Tic110, mesmo sendo uma proteína de membrana, interage com a chaperona Hsp93, que fica no estroma. Outras rotas alternativas de entrada de grandes moléculas nos plastos, independentes de Toc e Tic, também estão sendo descobertas. Um exemplo é a Oep16 (do inglês *outer envelope protein 16*), que serve como translocase, na membrana externa, para a proteína plastidial NADPH protoclorofilida oxidorredutase A.

O estroma existente no interior dos cloroplastos é uma matriz amorfa, rica em enzimas solúveis, incluindo as responsáveis pelas reações da fase bioquímica da fotossíntese. Também se encontram neste compartimento proteínas chaperonas (p. ex., GroEL e CpIC) que interagem com o complexo Tic para receber as proteínas importadas, clivar o seu peptídio sinal e enovelá-las até sua conformação madura final. Outras proteínas presentes no estroma, que pertencem à família M16 das metalopeptidases, são igualmente responsáveis pelo processo de clivagem do peptídio sinal e liberação da proteína madura no interior do estroma. Aí também se encontra uma variedade de estruturas que incluem:

- grânulos osmiofílicos (que têm afinidade pelo tetróxido de ósmio), denominados plastoglóbulos, com 10 a 500 nm de diâmetro, de natureza lipídica (Figura 13.16)
- grãos de amido pequenos, que nunca alcançam o tamanho daqueles presentes nos amiloplastos
- fitoferritina, um complexo de ferro e proteína
- ribossomos, de tamanho e composição diferentes dos presentes no citosol da mesma célula, denominados plastorribossomos
- moléculas circulares de DNA, de características semelhantes ao DNA das bactérias. Frequentemente, os cloroplastos de muitas algas contêm um grânulo denominado pirenoide, que pode representar um depósito de material de reserva ou uma estrutura relacionada com a formação do amido.

Todos os cloroplastos contêm membranas internas na forma de vesículas achatadas ou lamelas, que constituem um sistema de membranas chamado de tilacoide (do grego *thylakos*, saco); é nele que se encontra a clorofila. Mergulhadas no estroma, essas lamelas, diferentemente do que ocorre na mitocôndria, não se conectam com a membrana interna do cloroplasto (Figura 13.17). Essas membranas encerram um espaço intramembranoso contínuo, o espaço intratilacoide, de espessura variável entre 4 e 70 nm. As membranas dos tilacoides possuem pelo menos três conjuntos distintos de translocadores específicos para fazer a inserção de proteínas plastidiais traduzidas no citosol e que vão compor as membranas ou o lúmen dos tilacoides.

A ultraestrutura de todos os tipos de plastídeos é basicamente a mesma. O grau de desenvolvimento dos tilacoides é que é variável em relação ao tipo de plasto, sendo pouco desenvolvido ou ausente nos proplastos e proliferando-se conforme os proplastos se diferenciam.

Os tilacoides dão origem tanto a discos que ocorrem em pilhas de 10 a 20 lamelas discoides, como se fossem pilhas de moedas, que recebem o nome de *grana* (singular *granum*), como a sacos achatados que se estendem pelo estroma, interconectando os *grana*. Assim, nos cloroplastos de vegetais superiores, em que o sistema é mais desenvolvido, existem os tilacoides granares e os tilacoides estromáticos (Figuras 13.15 e 13.17). Os *grana* resultam em regiões verde-escuras que podem ser vistas ao microscópio de luz comum, em número variável entre 40 e 60 por cloroplasto, dependendo do tipo de planta e das condições fisiológicas. Seu diâmetro é de aproximadamente 0,3 a 2 mm e podem existir de 10 até 100 tilacoides por *granum*.

A membrana dos tilacoides consiste em uma bicamada lipídica de 7,0 nm de espessura, na qual estão embebidas duas classes de partículas intramembranosas de diferentes tamanhos (aproximadamente 17,5 e 11 nm de diâmetro), detectadas pela técnica de criofratura. As maiores partículas ocorrem principalmente nos *grana*, voltadas para o espaço intratilacoide, enquanto as menores, salientes do lado oposto da membrana (estroma), encontram-se tanto nos *grana* como nos tilacoides estromáticos. Isso sugere diferenças na composição e nas propriedades funcionais dessas duas lamelas. Nessas membranas é que se localizam as clorofilas e os demais pigmentos que participam da fotossíntese, os quais são ausentes nas membranas do envoltório da organela. Esses pigmentos estão ligados a diferentes proteínas e lipídios nas membranas dos tilacoides granares e estromáticos, constituindo dois diferentes complexos de proteína-clorofila, ou unidades fotossintéticas, denominados fotossistemas (FS). De fato, esses fotossistemas correspondem a partículas intramembranosas presentes nas membranas dos tilacoides, de onde dois tipos de fotossistemas podem ser isolados: os chamados fotossistemas I e II (FS I e FS II). O FS I se concentra, junto com a ATP sintase, em regiões do tilacoide expostas ao estroma, enquanto o FS II localiza-se, preferencialmente, em tilacoides granares (embora, nessa região, se encontrem ambos FS). O FS I constitui, assim, as menores partículas intramembranosas, enquanto o FS II compõe as partículas maiores. As diferenças funcionais que esse fato acarreta serão vistas mais adiante, neste capítulo.

O pigmento primário da fotossíntese, a molécula de clorofila (Figura 13.18A), pode ser de diferentes tipos, dependendo do vegetal. As mais abundantes são as clorofilas *a* e *b*. Ambas têm uma cauda hidrofóbica (cadeia de álcool fitol de 20 carbonos), que se insere entre a porção hidrofóbica de lipídios e proteínas da membrana, e uma cabeça hidrofílica, que mergulha na região hidrofílica da membrana. A cabeça é um grande anel de porfirina, tetrapirrólico, que inclui um átomo de magnésio. Nessa cabeça, um dos radicais *metil* ($-CH_3$) da clorofila *a* é substituído pelo radical *formil* ($-CHO$) na clorofila *b*. A esses complexos ainda se associam de 250 a 400 moléculas de outros pigmentos. Eles são lipossolúveis, da classe dos carotenoides, que inclui os carotenos ($C_{40}H_{56}$), como o bem conhecido betacaroteno (Figura 13.18B) e os carotenóis ($C_{40}H_{56}O_2$), como as xantofilas (Figura 13.18C), que são derivados oxigenados dos carotenos. Esses dois tipos de carotenoides consistem em anéis de carbono ligados por longas cadeias de carbono, em que se alternam ligações simples e duplas. Como anteriormente

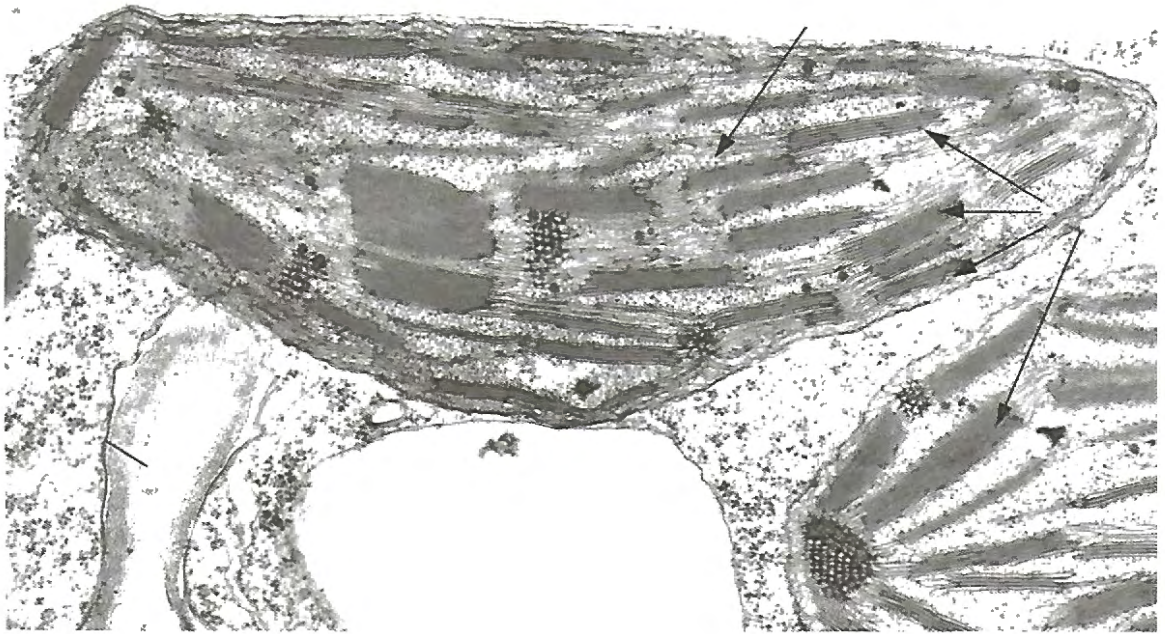



Figura 13.15 ▪ Eletromicrografia de corte de folha de milho (*Zea mays L.*) mostrando um grande cloroplasto com *grana*, membrana limitante e estroma. 27.000×. (Cortesia de E. W. Kitajima.)

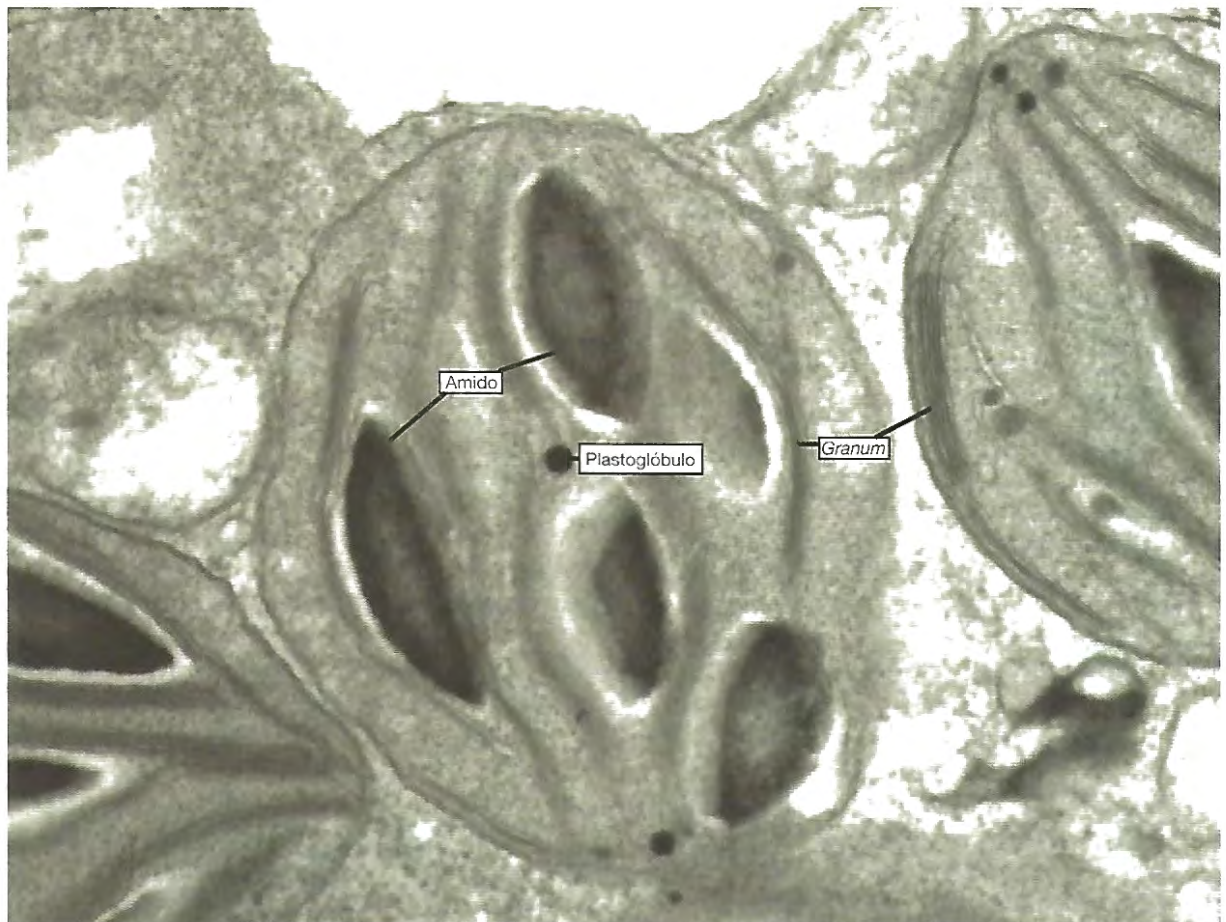



Figura 13.16 ▪ Eletromicrografia de corte de antera de *Rhynchospora pubera*, mostrando cloroplasto contendo grânulos osmiofílicos (com afinidade pelo tetróxido de ósmio) e grãos de amido no estroma. 26.500×. (Cortesia de J. A. B. San Martin.)

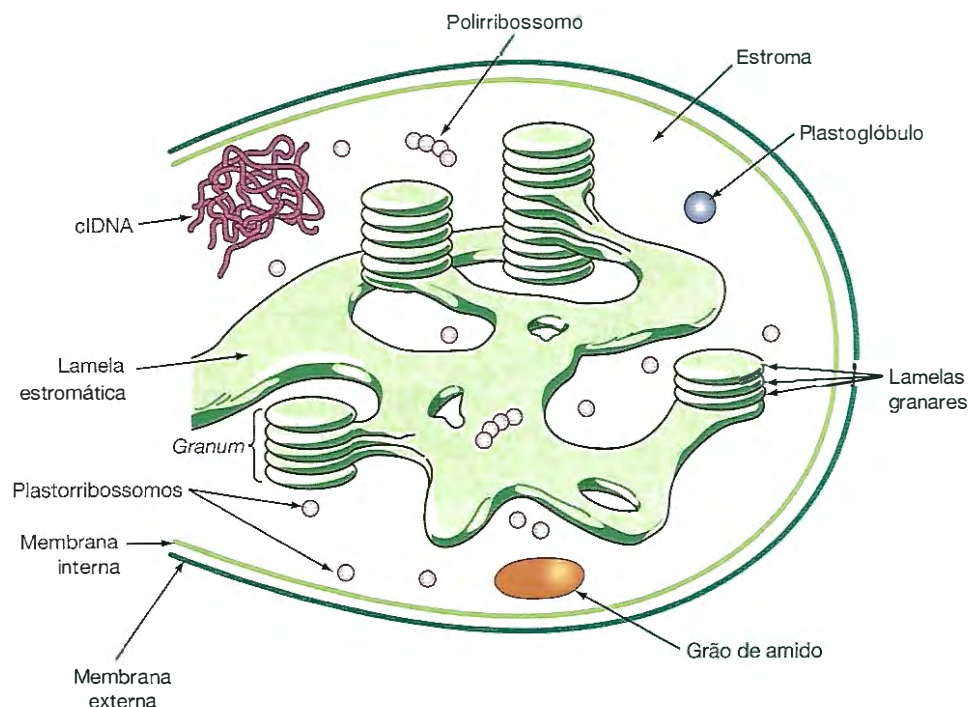



Figura 13.17 ▪ Estrutura dos cloroplastos de um vegetal superior. A organela é revestida por um envelope constituído pela membrana externa e membrana interna e com o espaço intermembranoso situado entre elas. Internamente, o estroma é o compartimento de maior tamanho, delimitado pelas duas membranas, que contém os tilacoides. Os tilacoides são constituídos por membranas que delimitam o espaço intratilacoide (não visível no desenho) e apresentam-se sob a forma de lamelas alongadas, os tilacoides estromáticos, e sob a forma de pilhas de vesículas achatadas, como moedas, constituindo os *grana* (singular: *granum*), os denominados tilacoides granares. O desenho mostra também o DNA do cloroplasto (clDNA) e outros componentes do estroma.

mencionado, estes pigmentos estão associados, nos fotossistemas, a lipídios e proteínas, as quais são moléculas anfipáticas, intrínsecas e transmembranosas (Figura 13.19). Outras proteínas importantes estão ainda presentes nas membranas dos tilacoides, como aquelas que compõem a cadeia fotossintética transportadora de elétrons, também intrínsecas, e outras extrínsecas, das quais se ressaltam a enzima fixadora de CO_2, ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase e o complexo ATP-sintase. Este último se encontra nos corpúsculos elementares, ou fatores de acoplamento da fotofosforilação, formados por partículas esféricas de 9 nm de diâmetro, denominadas partículas CF_1, e porções intramembranosas chamadas CF_0. Estes correspondem às chamadas partículas F_1F_0 das mitocôndrias, que estão presentes também na membrana interna. Tanto nos cloroplastos como nas mitocôndrias, a porção mais dilatada dos corpúsculos elementares faz saliência para dentro do estroma e logicamente estão presentes, preferencialmente, nas lamelas do estroma.

Cada tipo de fotossistema conta com um conjunto diferente de pigmentos que participam da fotossíntese e se arranjam em um complexo antena e um centro de reação. O fotossistema I (FS I) é composto principalmente de mais clorofila *a* do que clorofila *b*, diferentes carotenoides, especialmente carotenos, e de um centro de reação que se constitui de um par de moléculas de clorofila *a* que é excitável por luz de comprimentos de onda de 680 a 700 nm, e por isso conhecido como P700, associado às proteínas PsaA e PsaB. O fotossistema II (FS II), por sua vez, é composto por proporções iguais de clorofila *a* e clorofila *b*, por numerosos carotenoides, principalmente carotenóis. Também tem um centro de reação constituído por outro par de moléculas de clorofila *a* que tem absorção máxima a cerca de 670 a 680 nm, sendo conhecido como P680 e está associado às proteínas D1 e D2, consideradas o "coração" deste centro de reação. As formas de clorofila *a* P700 e P680 são quimicamente iguais, mas estão diferentemente associadas a moléculas proteicas e lipídicas. Os agregados de 200 a 300 moléculas de pigmentos chamados complexos antena ampliam o espectro de absorção de luz útil para a fotossíntese, pois cada um dos pigmentos que funciona como antena absorve luz em determinado comprimento de onda, transferindo essa energia de uma molécula para a seguinte, até alcançar o centro de reação específico do fotossistema (P700 ou P680). Basicamente, os fótons (partículas de energia luminosa) absorvidos pela clorofila *a* do centro de reação levam ao deslocamento de seus elétrons para níveis de mais alta energia nas órbitas de átomos da molécula, induzindo seu estado de excitação. Essa clorofila *a*, então, torna-se oxidada e positivamente carregada ao perder um elétron, que é transferido para um aceptor primário de elétrons específico de cada fotossistema. Esse aceptor é então reduzido e inicia um fluxo de elétrons. Aqui, as consequências químicas da absorção da luz realmente começam, pois essa energia é a que vai ser utilizada no processo de fotossíntese.

▪ Visão geral da fotossíntese

O processo pelo qual a energia do sol é captada e convertida em energia química, indicado pelo nome de fotossíntese, constitui a via pela qual praticamente toda a energia entra na

A Clorofila

B β-caroteno

C Xantofila

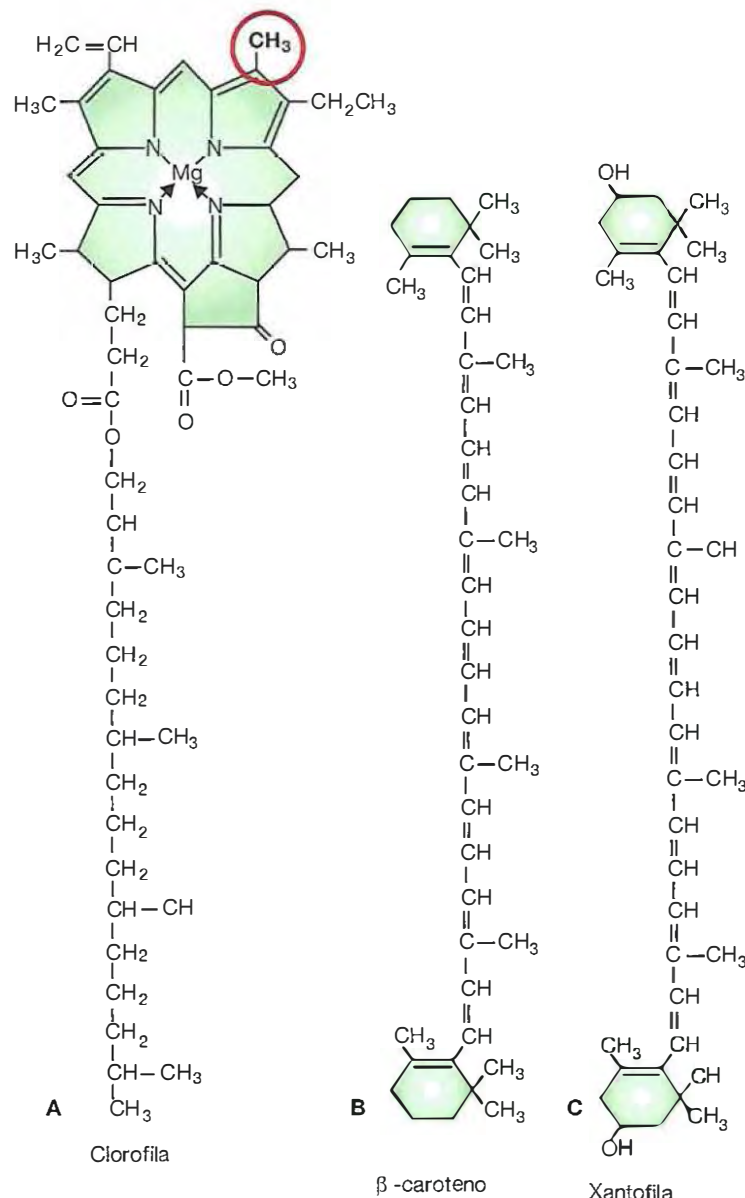
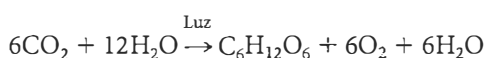



Figura 13.18 ▪ Estruturas moleculares representativas dos três tipos de pigmentos mais importantes das membranas internas dos cloroplastos. **A.** Clorofila: com um núcleo tetrapirrólico (anel de porfirina), contendo um íon Mg^{2+} central e com uma longa cadeia fitol, insolúvel em água, lipídica, ligada ao anel. A clorofila *b* difere da clorofila *a* por apresentar um grupo $-CHO$ no lugar do grupo $-CH_3$ que aparece circundado. **B.** Molécula de betacaroteno. **C.** Molécula de uma xantofila. Observe a alternância de ligações simples e duplas (conhecidas como ligações conjugadas), comuns entre os pigmentos, no anel porfirínico da clorofila e nas cadeias carbônicas.

biosfera. Estudos que vêm sendo feitos há mais de 200 anos foram demonstrando que:

- a fotossíntese usa dióxido de carbono produzido por combustão, ou que é exalado pelos animais, para produzir carbono
- a fotossíntese requer luz e água para liberar oxigênio
- a luz necessária para a fotossíntese é absorvida pela clorofila
- o oxigênio liberado durante a fotossíntese vem da água, e não do dióxido de carbono.

Portanto, no caso das algas e das plantas verdes, que usam a água como doadora de elétrons, a produção de glicose pela fotossíntese pode ser representada pela seguinte equação geral:

$$6CO_2 + 12H_2O \xrightarrow{\text{Luz}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 6H_2O$$

Mas o processo é bem mais complexo. Basicamente, a fotossíntese ocorre em duas etapas separadas e sucessivas (Figura 13.20). Na primeira etapa, ocorrem reações dependentes da luz, que se tornaram conhecidas como reações fotodependentes, reações de luz ou reações fotoquímicas da fotossíntese; estas convertem a energia luminosa em energia química, formando ATP a partir de ADP e reduzindo moléculas transportadoras de elétrons, principalmente a coenzima $NADP^+$ em NADPH. Nessa fase luminosa, também ocorrem oxidação de água (também chamada de fotoxidação ou oxidação fotossintética da água) e liberação de O_2. Na segunda etapa, não diretamente dependente de luz, o ATP e NADPH formados pelas reações fotoquímicas são utilizados para a síntese de hidratos de carbono (carboidratos) com a redução de CO_2 atmosférico; essa conversão do CO_2 em compostos orgânicos é conhecida como fixação do carbono. As reações dessa etapa

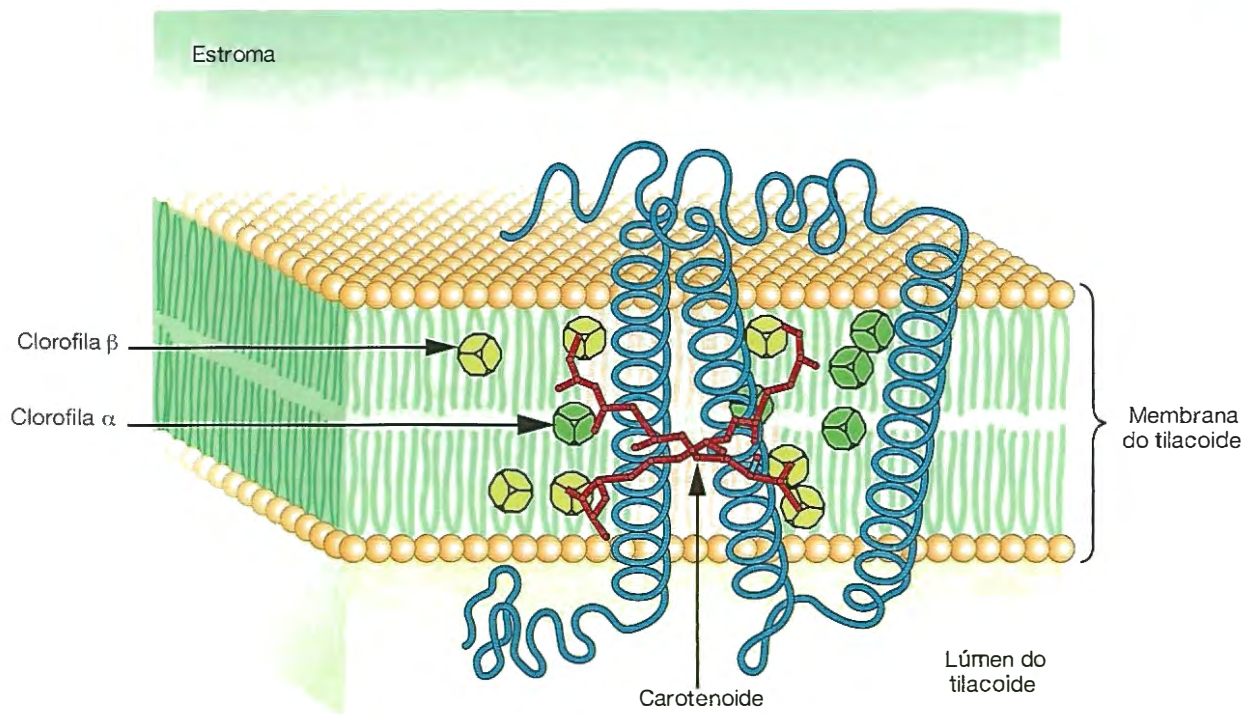



Figura 13.19 ▪ Esquema que mostra a interação entre pigmentos, lipídios e proteínas nas membranas do tilacoide dos cloroplastos, constituindo os fotossistemas. As proteínas estão representadas por moléculas transmembranosas multipasso.

denominam-se reações bioquímicas da fotossíntese e, como requerem energia luminosa apenas indiretamente, foram também chamadas de fotoindependentes ou reações de escuro. Essa denominação, no entanto, é inapropriada, uma vez que muitas enzimas envolvidas nessa etapa são inativas no escuro e reativadas apenas pelos processos estimulados pela luz. As reações fotoquímicas ocorrem nas membranas dos tilacoides, enquanto as reações bioquímicas ocorrem no estroma.

Como funcionam os fotossistemas na fotossíntese?

Reações fotoquímicas

Como explicado anteriormente, a energia luminosa é absorvida pelos pigmentos presentes em dois fotossistemas, FS I e FS II, que, quando iluminados, permitem que elétrons fluam da água para o $NADP^+$. Em geral, esses fotossistemas operam em série na membrana do tilacoide e a via de fluxo de elétrons se processa como representado na Figura 13.21.

A luz absorvida pelo FS I provoca a transferência de um par de elétrons da clorofila P700 para um aceptor primário de elétrons desse FS I, denominado A_0, que se acredita ser uma clorofila, e deste para a *ferrodoxina solúvel*. A ferrodoxina, então, se reoxida ao transferir os elétrons, por meio da ferrodoxina-$NADP^+$ redutase (uma flavoproteína), até a coenzima $NADP^+$, reduzindo-a a NADPH. Essa perda do elétron deixa a clorofila P700 com uma carga líquida positiva, o que permite que ela ganhe novamente um elétron de uma molécula doadora. Esse elétron é fornecido pelo FS II, que também está sendo energizado pela luz, mas essa transferência não é direta. O elétron flui por meio de uma cadeia transportadora de elétrons do FS II (P680) até o FS I (P700), gerando ATP no processo. Por sua vez, os elétrons ejetados da molécula P680 e transferidos para o aceptor do FS II (feofitina) e deste para uma quinona designada Q são substituídos por elétrons removidos da água. Quando os elétrons são extraídos da água, suas moléculas se dissociam em prótons e gás oxigênio, em uma reação fotodependente chamada de fotoxidação da água. A enzima que catalisa essa cisão se localiza nas membranas dos tilacoides, e a liberação dos prótons e moléculas de oxigênio se dá no espaço intratilacoide. Dois fótons precisam ser absorvidos pelo FS II e dois pelo FS I para que ocorra a redução de uma molécula de NADPH.

A transferência de elétrons do FS II para o FS I é feita por uma cadeia transportadora de elétrons, composta de uma série de moléculas como *plastoquinona* e *citocromos*, que está embebida na membrana do tilacoide e é parecida com a existente na membrana interna das mitocôndrias. Também participa dessa cadeia a *plastocianina*, uma molécula solúvel que transfere os elétrons para um aceptor final, que é a P700, o centro de reação do FS I. Os elétrons deslocam-se para níveis mais baixos de energia, e a transferência envolve também reações de oxidorredução em cada etapa, como na mitocôndria. Nessa cadeia, quando os elétrons alcançam transportadores transmembranosos que funcionam como bombas de prótons (íons H^+), induzem o transporte de H^+ através da membrana, criando, portanto, um gradiente de prótons que dirige a síntese de ATP, a partir de ADP mais Pi, de maneira análoga à que ocorre nas mitocôndrias (Figura 13.22). Os prótons fluem de volta para o estroma através de canais transmembranosos, que fazem parte do complexo CF_1CF_0, no qual está presente a enzima ATP-sintase (Figuras 13.21 e 13.22). Aproximadamente, a cada três H^+ que retornam, é produzido um ATP, que é liberado no estroma, no qual é usado na biossíntese de carboidratos. Nesse

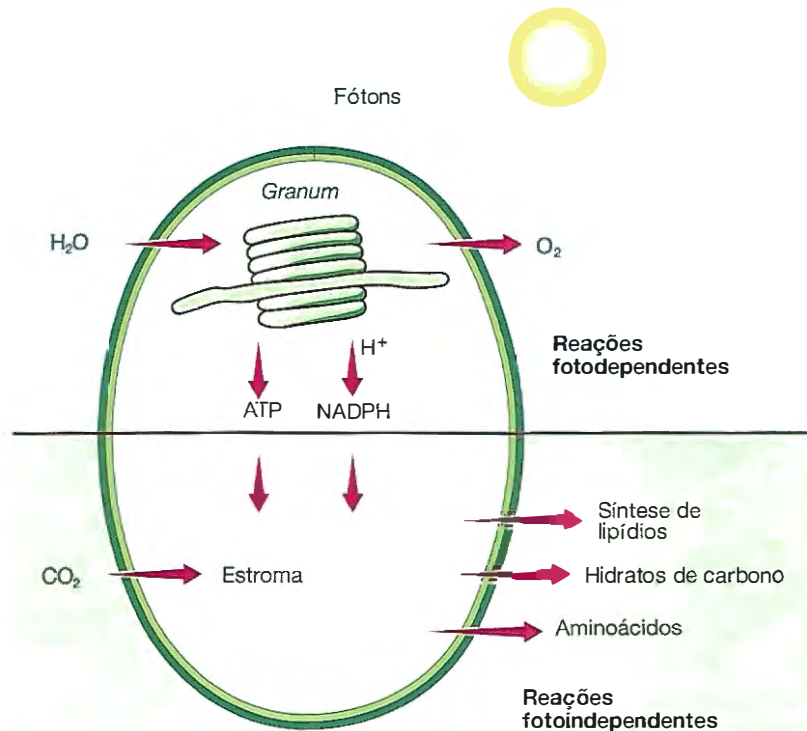



Figura 13.20 ▪ Esquema que ilustra o local de ocorrência das duas etapas da fotossíntese nos cloroplastos. As reações fotodependentes se dão nos tilacoides, principalmente nos *grana*, enquanto as reações fotoindependentes se processam no estroma dos cloroplastos.

caso, geralmente o ATP não é transportado para o citoplasma para ser usado em outras atividades celulares, como aquele produzido pela mitocôndria. A produção de ATP dirigida pela luz é chamada fotofosforilação e, como visto (Figura 13.22), ocorre de maneira muito semelhante à fosforilação oxidativa das mitocôndrias. A diferença é que, na mitocôndria, os prótons são bombeados para fora, no sentido da matriz para o espaço intermembranoso, e nos cloroplastos, os prótons são bombeados do estroma para dentro do espaço intratilacoide, no qual o pH é reduzido. A diferença de pH através da membrana do tilacoide desaparece rapidamente no escuro, o que demonstra que a luz é necessária para gerar esse gradiente de prótons.

Portanto, quando os dois fotossistemas trabalham de maneira simultânea e contínua, o fluxo de elétrons da água para o $NADP^+$ é unidirecional, e, nesse caso, a fotofosforilação é chamada não

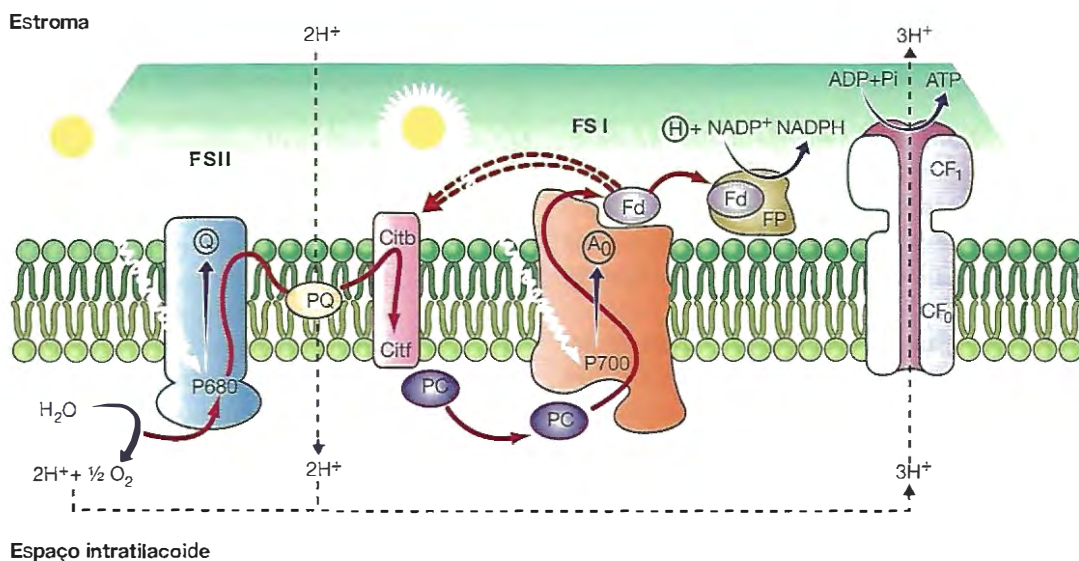



Figura 13.21 ▪ Esquema que mostra as relações funcionais entre fotossistema II (FS II), o complexo citocromo b_6-citocromo f(citb-citf), fotossistema I (FS 1) e o complexo ATP-sintase CF_0CF_1 dentro da membrana do tilacoide. As linhas contínuas com flechas representam o fluxo de e^- através da membrana, desde a molécula de H_2O até o NADPH. As linhas descontínuas com flechas representam o fluxo de prótons. Note que os prótons são translocados para o espaço intratilacoide, dando origem a um gradiente quimiosmótico que se constitui na força motriz da síntese de ATP pelo complexo ATP-sintase. Q e A_0 representam, respectivamente, uma quinona e uma clorofila *a* especial, aceptores de e^- do FS II e do FS I. PC: plastocianina; Fd: ferrodoxina; FP: flavoproteína. A dupla linha pontilhada indica a direção do fluxo cíclico de e^-, que leva à fotofosforilação cíclica.

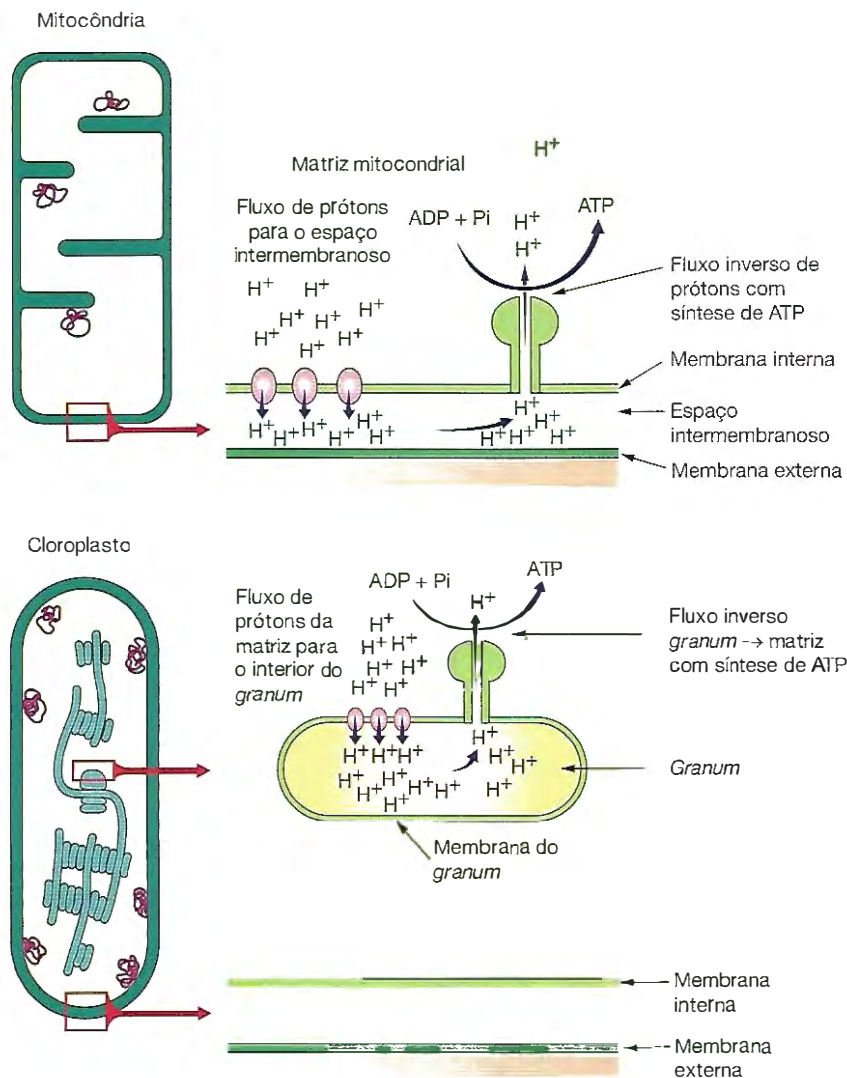



Figura 13.22 ▪ Esquema que ilustra as semelhanças e diferenças entre a estrutura e atividade das mitocôndrias e cloroplastos no que se refere à produção de ATP. Nas mitocôndrias, a energia dos elétrons provenientes da degradação de compostos ricos em energia é utilizada para criar um fluxo de prótons para dentro do espaço intermembranoso, criando um gradiente que gera um fluxo de prótons em direção à matriz mitocondrial, levando à síntese de ATP. Nas mitocôndrias, o ATP é exportado para o citosol, onde é utilizado nas atividades celulares. Nas plantas, a energia dos elétrons ativados pela luz solar gera um fluxo de prótons para dentro do tilacoide, criando um gradiente de prótons, que fluem em direção à matriz, sendo a energia acumulada em ATP, e este utilizado na síntese de compostos orgânicos dentro do próprio cloroplasto. Ao contrário das mitocôndrias, os cloroplastos não exportam ATP para o citosol.

cíclica. Entretanto, há situações em que o FS I pode trabalhar independentemente do FS II. O processo se dá por um fluxo cíclico de elétrons (Figura 13.21). Os elétrons, quando impulsionados do P700 para a ferrodoxina aceptora, em lugar de serem transferidos para o $NADP^+$, são passados para um aceptor da mesma cadeia transportadora de elétrons que interliga o FS I ao FS II. Por essa via, os elétrons retornam ao centro de reação do FS I e, nessa passagem, o ATP é produzido por fotofosforilação cíclica. Nesse processo, o único produto é o ATP, não ocorrendo fotoxidação da água com desprendimento de O_2 nem redução do $NADP^+$. Em procariontes fotossintéticos, esta é a única forma de transporte de elétrons. Nos eucariontes fotossintéticos, essa fotofosforilação cíclica parece ocorrer se a quantidade de $NADP^+$ disponível no cloroplasto for baixa, ou se as células necessitarem de ATP adicional para outras atividades metabólicas.

Considerando, como visto anteriormente, que a distribuição dos fotossistemas nas membranas dos tilacoides não é uniforme, havendo pouco ou nenhum FS II nos tilacoides estromáticos, apenas as células que têm cloroplastos granares (com *grana*) conseguem desenvolver a fotossíntese completa utilizando a via não cíclica. No entanto, contrariando a ideia de que ambos os FS são necessários para a fotossíntese, no ano de 1997, descobriu-se um mutante da alga unicelular *Clamydomonas* que libera O_2, fixa CO_2, mas não tem o FS I. Como esses mutantes crescem melhor na ausência de oxigênio, sugere-se que as formas primitivas de fotossíntese teriam utilizado somente o FS II, inicialmente sob condições anaeróbicas, até que, na atmosfera, se acumulasse O_2 e, então, o FS I se desenvolvesse.

▪ Reações bioquímicas

Nas reações fotoquímicas que acabaram de ser descritas, o NADPH e o ATP são formados no estroma do cloroplasto, no qual eles são usados nas reações bioquímicas para reduzir dióxido de carbono (CO_2) a carboidrato, o nutriente básico da vida. As principais reações bioquímicas que ocorrem nos cloroplastos estão ilustradas na Figura 13.23.

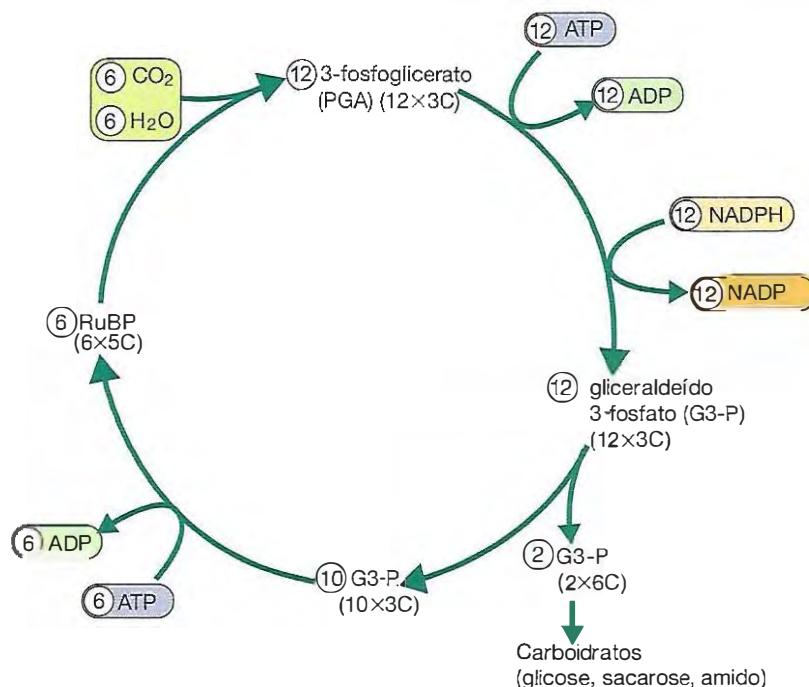



Figura 13.23 ▪ Esquema simplificado do ciclo de Calvin, que ocorre na fase escura da fotossíntese. O CO_2 é incorporado à ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), formando uma hexose instável, que logo se decompõe em duas moléculas da triose fosfoglicerato (PGA). Este pode ser usado diretamente para a síntese de ácidos graxos e aminoácidos, ou então sofre novas modificações, que incluem fosforilação, com gasto de ATP e NADPH, produzindo compostos a partir dos quais são sintetizados os glicídios ou a RuBP é regenerada. Esta pode combinar-se com o CO_2, iniciando assim um novo ciclo. São indicados os números de moléculas que reagem a cada volta do ciclo para produzir uma molécula de carboidrato.

O CO_2 chega às células fotossintetizantes da maioria das plantas através de aberturas reguladas, presentes nas folhas e caules verdes, que se chamam estômatos. Por difusão, atinge o estroma do cloroplasto, no qual é reduzido por meio de uma série de reações químicas conhecidas como ciclo de Calvin, em homenagem ao pesquisador que as elucidou. O processo se inicia quando o CO_2 é fixado, ou seja, é incorporado em um composto orgânico, por meio de ligação covalente. Esse composto é um açúcar de 5 carbonos que contém dois grupos fosfato, chamado de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP). O produto resultante é uma molécula instável de 6 carbonos que, imediatamente, se quebra em duas moléculas de 3 carbonos, o 3-fosfoglicerato (3-PGA). A enzima que catalisa essa reação é a RuBP carboxilase, também denominada RUBISCO, uma molécula grande que consiste em oito subunidades grandes (cerca de 55 kDa) e oito pequenas (cerca de 15 kDa). Essa enzima, sozinha, representa a metade das proteínas do estroma, sendo considerada a proteína mais abundante da natureza, dada a enorme quantidade de vegetais fotossintéticos existentes na Terra. Em seguida, ATP e NADPH, produzidos nas reações fotoquímicas, são usados para reduzir 3-PGA a gliceraldeído 3-fosfato (G3-P) ou 3-fosfogliceraldeído, um açúcar de 3 carbonos. Esses açúcares são chamados de trioses. Algumas dessas moléculas formadas são usadas para regenerar RuBP, fechando o ciclo. O restante do G3-P serve de precursor para diversas vias metabólicas, pelas quais são sintetizados açúcares e outros componentes celulares.

Assim, o primeiro produto estável da fotossíntese é uma molécula de 3 carbonos, o 3-fosfoglicerato (3-PGA). Isso explica por que o ciclo de Calvin é também chamado de ciclo ou via de três carbonos – via C_3. Da mesma forma, as plantas que usam somente essa via para fixar CO_2 são chamadas de plantas C_3. Elas são as mais comuns e abundantes na superfície terrestre, constituindo aproximadamente 85% das espécies, incluindo as plantas cultivadas, como mandioca, soja e algodão, determinadas gramíneas, como arroz, trigo, aveia e centeio, além de tabaco, espinafre e outras.

▪ Produtos da fotossíntese

O gliceraldeído 3-fosfato (G3-P) é um importante metabólito sintetizado nos cloroplastos e que serve de precursor para diversos hidratos de carbono.

Geralmente se representa a glicose como o principal produto da fotossíntese, mas é muito pequena a quantidade de glicose livre gerada nas células fotossintéticas. A maior parte do carbono fixado é convertida preferencialmente em sacarose ou em amido (α-1,4 glicana). Isso ocorre porque uma grande parte do G3-P produzido pelo ciclo de Calvin é transferida para o citosol, no qual ocorrem reações que o transformam rapidamente em sacarose, um dissacarídio constituído de glicose e frutose e o principal açúcar de transporte das plantas. A parte da triose-fosfato que permanece no cloroplasto é convertida no polímero amido, principal carboidrato de reserva dos vegetais, que, durante o dia, é estocado na forma de grãos de amido dentro do estroma (Figura 13.16) e, à noite, é transformado em sacarose, para ser exportado para outras partes da planta. De fato, as pequenas moléculas, trioses ou hexoses, não se acumulam no estroma, o que evita a elevação da pressão osmótica interna da organela.

Ainda quando transferida para o citosol, a triose-fosfato G3-P pode ser também utilizada para a síntese de diversas outras moléculas, como aminoácidos, metabólitos secundá-

rios como látex e, até mesmo, a celulose. Também pode entrar diretamente na via da glicólise, produzindo piruvato, que, por sua vez, pode ser aproveitado pelas mitocôndrias na síntese de ATP, ou pelo próprio cloroplasto, como precursor da síntese de aminoácidos.

Vários são os aminoácidos sintetizados no estroma do cloroplasto, incluindo os aminoácidos essenciais triptofano, fenilalanina e tirosina. Essa síntese ocorre por redução de nitrito ou de sulfato, que também consome NADPH e ATP produzidos na fase fotoquímica da fotossíntese. Esses aminoácidos são, em parte, usados no próprio cloroplasto para a síntese de proteínas pelos plastorribossomos e, em parte, são exportados para o citosol ou mitocôndrias, onde também participam da síntese proteica.

Nos cloroplastos, as duas formas de energia, ATP e NADPH, são usadas ainda para a síntese de lipídios e de componentes lipídicos de suas membranas, como os próprios pigmentos fotossintéticos.

Recentemente descobriu-se que, os plastos, além do citosol, são também locais da síntese de difosfato de isopentenil (IPP) a partir de um piruvato, o 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DOXP). O IPP é precursor de terpenos, esteróis, carotenoides e isoprenoides, importantes componentes de diversas moléculas celulares, tais como clorofilas e quinonas.

Os produtos diretos ou indiretos da fotossíntese são, assim, tão amplos e importantes que, virtualmente, sustentam toda a vida na Terra.

Fixação de CO_2 pela via C_4

Em algumas plantas, o primeiro produto da fixação de CO_2 não é a molécula de PGA, com 3 carbonos, e, sim, uma molécula de 4 carbonos, o oxaloacetato. Daí, as plantas que empregam essa via, junto com a do ciclo de Calvin, serem chamadas de plantas C_4. Essas plantas ocorrem entre membros de, pelo menos, 19 famílias que são principalmente espécies tropicais, com altas taxas de crescimento e alta eficiência fotossintética. Incluem as gramíneas cultivadas que têm alta capacidade produtiva, como o milho, o sorgo e a cana-de-açúcar. As plantas C_4 apresentam maior eficiência no uso da água e são adaptadas a regiões quentes, secas e com grande irradiação, não tendo sucesso em temperaturas baixas, ao competirem com as plantas C_3, pois são mais sensíveis ao frio e têm um custo energético maior, por necessitarem de mais ATP para fixar o carbono.

A associação entre a via C_4 e o ciclo de Calvin só é possível por causa da interação de dois tipos celulares nas folhas das plantas C_4 (Figura 13.24). Uma camada mais externa de células, adjacente à epiderme da folha e constituída pelas células do mesófilo, circunda uma camada de células mais interna, adjacente ao tecido vascular, que são as células da bainha perivascular. Esse arranjo celular se chama anatomia *Kranz*, palavra alemã que significa coroa, halo. Entre esses dois tipos de células fotossintéticas existem abundantes plasmodesmos, para o grande fluxo de metabólitos observado entre elas e uma lamela de suberina, que reduz a permeabilidade ao CO_2.

Como representado na Figura 13.24, as células do mesófilo captam CO_2 na superfície da folha, que é fixado a um com-

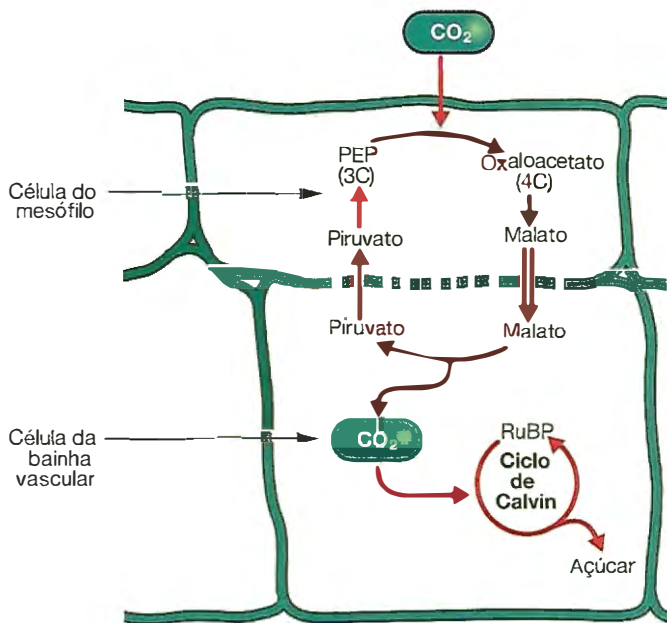



Figura 13.24 ▪ Esquema das vias de fixação de carbono nas plantas C_4. CO_2 é fixado pela fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase das células do mesófilo, produzindo oxaloacetato ou aspartato (não representado). Esses compostos de 4 carbonos servem como transportadores de CO_2 para as células da bainha vascular, em que é liberado e usado para a síntese de açúcares pelo ciclo de Calvin.

posto diferente, o fosfoenolpiruvato (PEP), com 3 carbonos, resultando em um composto com 4 carbonos, o oxaloacetato. Essa reação é catalisada pela enzima PEP carboxilase, encontrada no citosol das células do mesófilo, que não contêm a enzima RUBISCO. *(A PEP carboxilase utiliza como substrato a forma hidratada do CO_2, o íon bicarbonato HCO_3^-, em lugar do CO_2.)* Dependendo da espécie, o oxaloacetato é reduzido a malato, já nos cloroplastos, ou convertido em aspartato, ainda no citosol das mesmas células. O malato e o aspartato passam para as células da bainha vascular da folha, onde são descarboxilados, liberando CO_2 e piruvato. O CO_2 entra no ciclo de Calvin, que ocorre normalmente nessas células e o piruvato retorna às células do mesófilo. Aí reagem com o ATP para formar mais PEP.

As plantas C_4, que vivem nas regiões quentes e áridas ou delas são originárias, mantêm os seus estômatos fechados por longos períodos, para evitar a perda excessiva de água. Por isso, durante o dia, nessas plantas, a concentração de CO_2 nas folhas é baixa demais para que ele possa ser incorporado diretamente no ciclo de Calvin. Mas essa baixa concentração pode ser incorporada nos compostos de 4 carbonos, que, quando são descarboxilados, aumentam consideravelmente (de 20 a 120 vezes) a concentração de CO_2 nas células da bainha vascular. Assim, esse ciclo de C_4, com sua compartimentalização intercelular, representa um sistema eficiente para concentrar o CO_2 nas células que desenvolvem o ciclo de Calvin, o que limita ou inibe a fotorrespiração (discutida mais adiante) e mantém um rendimento fotossintético elevado.

Outra característica de algumas plantas C_4, apenas daquelas formadoras de malato (p. ex., milho, cana-de-açúcar) é que as células do mesófilo contêm cloroplastos com *grana* bem desenvolvidos, porém, nas células da bainha vascular, os clo-

roplastos são agranares, ou seja, deficientes em FS II. Por causa disso, nessas células, o NADPH necessário para o ciclo de Calvin não provém da fotólise da água, mas da descarboxilação do malato. Já nas células formadoras de aspartato, as células da bainha vascular têm cloroplastos granares e, portanto, FS II funcionais.

O metabolismo ácido das Crassuláceas – plantas MAC

Dentre os vegetais superiores, existe ainda um terceiro grupo de plantas com metabolismo fotossintético adaptativo, que inclui aquelas que se tornam ácidas à noite e progressivamente mais básicas durante o dia. Mais bem adaptadas a condições muito áridas, elas abrem seus estômatos à noite e fixam CO_2 em malato, que fica estocado em grandes vacúolos, provocando a queda do pH. Durante o dia, o carbono do malato é incorporado aos carboidratos pelo ciclo de Calvin. Todas essas reações ocorrem na mesma célula, embora separadas no tempo, o que é diferente do que acontece nas plantas C_4. Plantas com esse metabolismo fotossintético são conhecidas como plantas com metabolismo ácido das Crassuláceas (MAC), porque foram descobertas entre os membros dessa família. Entretanto, esse grupo inclui pelo menos 23 famílias de plantas, dentre as quais a mais conhecida é o abacaxi. Em sua maioria são plantas suculentas, como os cactos, ainda que nem todas as suculentas sejam plantas MAC.

Figura 13.25 ▪ Reações catalisadas pela ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO). A adição de CO_2 à ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), que tem 5 carbonos, leva, em uma série de reações não representadas, à formação de duas moléculas de 3 carbonos, o 3-fosfoglicerato (PGA), precursor dos açúcares no ciclo de Calvin. Na presença de O_2, a enzima realiza a oxigenação de RuBP, produzindo um 3-fosfoglicerato (PGA), com 3 carbonos e um fosfoglicolato, com 2 carbonos. Este último será convertido em glicina pela fotorrespiração.

Fotorrespiração

A fotossíntese nas plantas C_3 é sempre acompanhada pela fotorrespiração, um processo que, em presença de luz, consome oxigênio e libera gás carbônico, o que justifica o seu nome. Esse processo, no entanto, é muito diferente da respiração mitocondrial, uma vez que não está acoplado à síntese de ATP, como no caso da mitocôndria.

A fotorrespiração ocorre porque a mesma enzima que fixa o CO_2 na ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) é igualmente capaz de catalisar a adição de O_2 à RuBP. Na realidade, essa enzima, a RUBISCO, tem dupla atividade e, por isso, seu nome completo é RuBP carboxilase/oxigenase. Sua atividade carboxilase ou oxigenase depende das concentrações de CO_2 e O_2 no estroma do cloroplasto. Quando a concentração de CO_2 é alta e a de O_2 é relativamente baixa, a RuBP age como carboxilase, ligando CO_2 à RuBP e produzindo 2 moléculas de PGA, que são transformadas no ciclo de Calvin. Quando a situação se inverte e a concentração de O_2 é relativamente mais alta que a de CO_2, a enzima opera como oxigenase, combinando RuBP e oxigênio para produzir uma molécula de fosfoglicolato, que tem dois carbonos, e uma de PGA, que tem três carbonos (Figura 13.25). Nas plantas C_3, a concentração dos dois gases permite que as duas reações ocorram simultaneamente, o que faz com que a fotossíntese seja menos eficiente.

O fosfoglicolato proveniente da oxidação da RuBP é, ainda no estroma, desfosforilado em glicolato, que é então oxidado a glioxilato e posteriormente convertido em dois aminoácidos: glicina e serina. Essas reações se dão por uma via complexa, chamada via glicólica, que tem início no cloroplasto e continua em outras duas organelas: peroxissomos (que serão ainda mencionados neste capítulo) e mitocôndrias (Figura 13.26). Em função do papel cooperativo entre as três organelas na fotorrespiração, geralmente peroxissomos e mitocôndrias são vistos ao lado de cloroplastos no citoplasma das células fotossintéticas de plantas C_3 (Figura 13.27).

Durante a via glicólica, há consumo de O_2 (no peroxissomo), acompanhado do desprendimento de CO_2 (na mitocôndria),

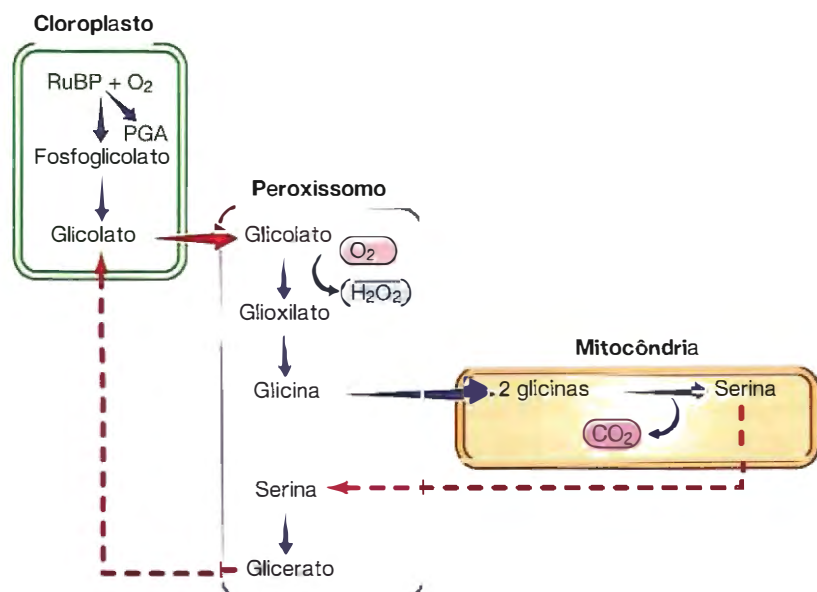



Figura 13.26 ▪ Reações do processo de fotorrespiração, que se inicia no cloroplasto, com a reação oxigenase da RUBISCO, e continua por meio de conversões químicas que envolvem enzimas dos peroxissomos e das mitocôndrias de uma mesma célula nas folhas de plantas C_3.

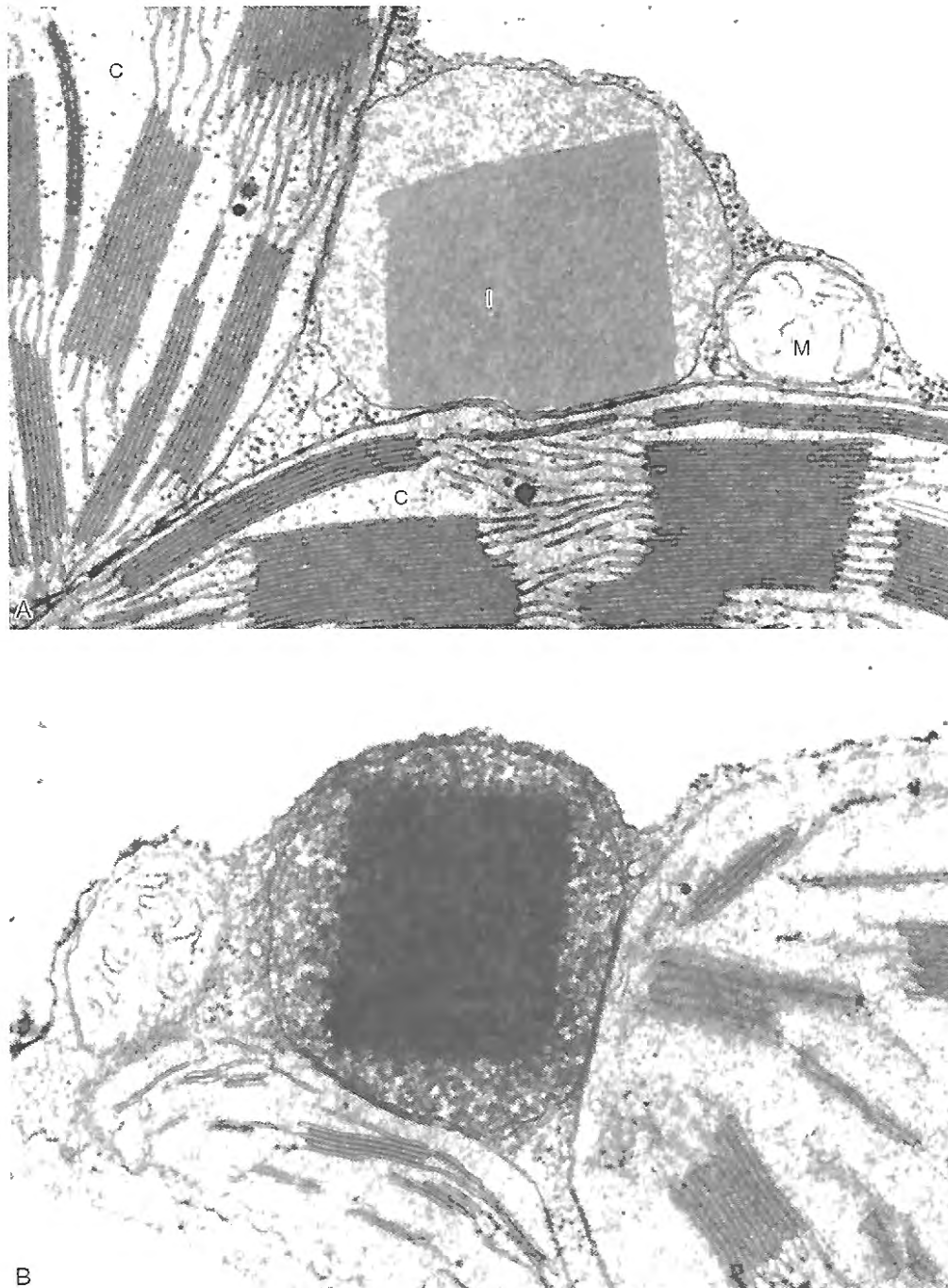



Figura 13.27 ▪ Micrografias eletrônicas de folha de fumo, mostrando um peroxissomo localizado ao lado de dois cloroplastos (C) e uma mitocôndria (M), o que demonstra sua atuação conjunta nas reações de fotorrespiração. **A.** Matriz amorfa do peroxissomo, em cujo interior nota-se uma inclusão cristalina (I). 51.000×. **B.** O mesmo material após detecção citoquímica de catalase. A reação positiva para catalase (depósito elétron-denso) demonstra que essa enzima localiza-se na matriz amorfa e na inclusão cristalina do peroxissomo. 44.000×. (Frederick, S.E. and Newcomb, E.H. *J. Cell Biol.*, **43**:343; reproduzida com permissão.)

além do O_2 inicialmente incorporado no cloroplasto para produzir fosfoglicolato. Essas trocas gasosas da fotorrespiração constituem um fator de desperdício e de queda da eficiência da fotossíntese nas plantas C_3. Em muitas dessas plantas, cerca de 1/3 do CO_2 fixado é novamente perdido como CO_2, devido à fotorrespiração.

Este pode ser um problema para plantas que vivem em condições de alta temperatura e intensidade luminosa e baixa umidade, que fecham seus estômatos para evitar perda excessiva de água, o que leva a uma diminuição dos níveis de CO_2 nas folhas, favorecendo, assim, a fotorrespiração. Algumas plantas que vivem em ambientes quentes e secos, entretanto, são capazes de fugir desse problema. São as plantas C_4 (citadas anteriormente neste capítulo), cujo metabolismo especial faz elevar a concentração de CO_2 em relação a O_2 nas células da bainha vascular, o que inibe a atividade oxigenase da RuBP e a fotorrespiração associada. Assim, tendo suprimido a fotorrespiração, as plantas C_4 são fotossinteticamente mais eficientes e mais produtivas em altas temperaturas do que as plantas C_3, sendo talvez esta a razão de sua relativa abundância nesse clima. Por outro lado, observações recentes sugerem que, em climas secos e quentes, a fotorrespiração seja um vantajoso

mecanismo de proteção das plantas C_3 contra a fotoxidação e a fotoinibição. Ela seria importante para dissipar o excesso de ATP e o poder redutor das reações de luz e, assim, impedir que o aparelho fotossintético seja danificado pela ação destrutiva de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que se formam sob alta incidência luminosa. Também, admite-se que seja um mecanismo de desintoxicação das plantas, por eliminar acúmulos de glicolato que seriam tóxicos. No entanto, ainda hoje não se conhece satisfatoriamente o significado biológico da fotorrespiração.

Sistema genético dos plastos

Cloroplastos e os demais tipos de plastos contêm seu próprio sistema genético, que, juntamente com aquele da mitocôndria, é separado e distinto do genoma nuclear da célula, constituindo o chamado DNA extranuclear. O genoma plastidial consiste em uma pequena molécula de DNA circular, com características muito semelhantes ao de bactérias e mitocôndrias. Isso reflete sua origem evolutiva a partir de bactérias fotossintéticas. Entretanto, o DNA dos plastos ocorre em quantidade maior e é mais complexo do que aquele de mitocôndrias. Há 30 a 200 cópias de DNA por organela. Seu tamanho varia entre 120 e 190 kb (quilobase = 1.000 pares de bases), contendo aproximadamente 120 genes, número bem maior do que o contido no genoma mitocondrial, onde há cerca de 13 genes.

O sequenciamento genético dos cloroplastos de várias plantas levou à identificação de muitos desses genes. Eles transcrevem todos os rRNA (23S, 16S, 5S e 4,5S) que compõem os plastorribossomos e 30 tipos diferentes de RNA transportadores, ambos usados na tradução dos RNA mensageiros codificados pelo genoma da organela. Esse genoma codifica ainda cerca de 20 proteínas ribossômicas e algumas subunidades da RNA polimerase, que são proteínas envolvidas na expressão gênica. Também aproximadamente 30 proteínas que atuam na fotossíntese são codificadas pelos genes plastidiais, como componentes dos fotossistemas, dos citocromos e da ATP-sintase. O exemplo mais interessante é o da enzima RUBISCO, crítica para a fixação de carbono na fotossíntese, que tem a síntese de suas subunidades grandes codificada pelo genoma do cloroplasto e a das subunidades pequenas codificada pelo genoma nuclear.

Mesmo sintetizando suas próprias proteínas, cerca de 90% das proteínas do cloroplasto, inclusive muitas das proteínas necessárias para a fotossíntese, são codificadas pelos genes nucleares. As proteínas dos plastos, especialmente dos cloroplastos, codificadas pelo genoma nuclear são sintetizadas no citosol e têm que ser importadas para os seis compartimentos da organela. Isso é facilitado por serem marcadas com uma sequência N-terminal variável, de 20 a 150 aminoácidos, em geral hidrofóbica, rica em aminoácidos hidroxilados e poucos ácidos, que permite sua translocação por translocadores específicos das duas membranas plastidiais (na maioria dos casos pelos já descritos Toc e Tic). Essa sequência é clivada por peptidases do estroma pertencentes à família M16, anteriormente mencionada. Em algumas proteínas, uma segunda sequência sinal é então exposta, direcionando a proteína para compartimentos mais internos do cloroplasto: a membrana do tilacoide e o espaço intratilacoide.

Peroxissomos e glioxissomos

Os peroxissomos e os glioxissomos são organelas em geral esféricas, com 0,5 a 1,5 mm de diâmetro, delimitadas por uma única membrana, com cerca de 6,0 nm de espessura. Em sua matriz, finamente granular, algumas vezes é observada uma estrutura cristalina elétron-densa (Figura 13.27). Aparecem dispersos pelo citoplasma ou podem estar próximos a outras organelas ou inclusões citoplasmáticas, como mitocôndrias e cloroplastos ou gotas lipídicas. Essa distribuição está relacionada com suas atividades funcionais. Diferenciam-se bioquimicamente dos lisossomos, organelas às quais se assemelham morfologicamente, por terem um conteúdo enzimático diferente. Conforme o organismo, tipo celular ou estágio de diferenciação, apresentam enzimas diferentes, que são específicas para determinadas vias metabólicas. Assim, os peroxissomos, que ocorrem tanto em células animais como em vegetais, principalmente nas folhas de plantas que realizam fotorrespiração, contêm enzimas que catalisam reações básicas comuns, mas que atuam em vias metabólicas às vezes específicas dos animais ou dos vegetais. Um tipo específico de peroxissomos, os glioxissomos, ocorre apenas em sementes oleaginosas e plântulas que se desenvolvem a partir dessas sementes. Parte das suas enzimas é específica para funções só desempenhadas por ele nessas células (veja adiante, neste capítulo).

Todos os peroxissomos se caracterizam pela presença de dois tipos de enzimas: as oxidases, que catalisam a oxidação de substratos a partir do oxigênio molecular, com produção de peróxido de hidrogênio ou água oxigenada (H_2O_2), e as catalases, que tanto decompõem essa H_2O_2, formando água, como catalisam a peroxidação de substratos hidrogenados. As oxidações aqui realizadas não levam à fosforilação do ADP em ATP e, por isso, são diferentes daquelas realizadas nas mitocôndrias. A ação das catalases é importante, pois a água oxigenada é tóxica para as células, já que pode oxidar muitas moléculas celulares e, assim, desnaturá-las. São muitos os substratos para essas duas enzimas presentes na matriz dos peroxissomos. Como exemplo, acil-CoA e aminoácidos podem ser oxidados pelas oxidases, respectivamente em enoil-CoA e α-cetoácidos; etanol e metanol podem ser peroxidados, respectivamente, em acetaldeído e formaldeído por ação das catalases.

Apesar de apresentarem sempre oxidases e catalases, os peroxissomos nem sempre têm o mesmo conjunto enzimático, como já mencionado, e, assim, assumem papéis fisiológicos específicos. Nos vegetais, têm papéis importantes no metabolismo de diferentes células.

Metabolismo de lipídios

Os peroxissomos têm duplo papel no metabolismo de lipídios. Eles realizam a β-oxidação (degradação) de ácidos graxos, por meio de uma sequência de reações que resultam na produção de acetil-CoA. Durante essa sequência, forma-se H_2O_2, que é decomposta pela catalase. Essa atividade, que é também realizada pela mitocôndria, ocorre não só nas célu-

las vegetais, mas também nas células animais e em determinados protozoários, como o flagelado *Euglena* e o ciliado *Tetrahymena*. O acetil-CoA produzido nos peroxissomos pode então entrar em duas diferentes vias metabólicas: (a) ser transferido diretamente para a mitocôndria, para participar do ciclo de Krebs, ou (b) permanecer no peroxissomo e completar seu papel no metabolismo de lipídios.

Nesta segunda alternativa, duas moléculas de acetil-CoA alimentam o ciclo do glioxilato, formando uma molécula de ácido succínico. Este passa para a mitocôndria, onde é convertido em ácido oxalacético, que, no citosol, torna-se precursor da glicose, em uma via chamada de neoglicogênese. Resumidamente, essas reações, associadas à β-oxidação, permitem a síntese de glicídios a partir de lipídios. Essa via metabólica acontece em células dos tecidos de reserva das sementes oleaginosas, como rícino, algodão, amendoim e girassol, durante sua germinação. A glicose produzida a partir dos lipídios de reserva nas sementes é distribuída para a plântula em formação e serve de fonte energética até que os cloroplastos, que começam a se diferenciar nas folhas jovens, iniciem a fotossíntese. Essa mesma via acontece também na euglena. Os peroxissomos que, além das enzimas da β-oxidação também contêm as do ciclo glioxílico são chamados glioxissomos. Essas organelas aparecem sempre próximas às mitocôndrias e às gotas de reserva de lipídios.

▪ *Participação na fotorrespiração: metabolismo do glicolato*

Outro tipo de metabolismo específico das células vegetais do qual participam os peroxissomos é a oxidação do glicolato durante a fotorrespiração, já explicada anteriormente, neste capítulo. Esta ocorre por uma via complexa, chamada via glicolítica, que envolve a cooperação funcional dos cloroplastos, dos peroxissomos e das mitocôndrias, de células das folhas das plantas C_3 (Figura 13.27). Os peroxissomos participam realizando reações de oxidação e de peroxidação por meio de suas oxidases e catalases.

▪ Biotecnologia vegetal

Como foi observado ao longo deste capítulo, as células vegetais são de importância fundamental na Terra, pois elas proporcionam o único processo renovável de conversão de energia solar em energia química armazenável, permitindo que as plantas se posicionem como produtores primários em todas as cadeias alimentares. Por isso, a humanidade começou muito cedo a ter interesse pelo desenvolvimento da agricultura. Visando ao aumento da produtividade agrícola, o homem sempre lançou mão do emprego de novas práticas de cultivo, de novas tecnologias e de variedades melhoradas de plantas. Nesse sentido, técnicas modernas de biologia molecular, conhecidas sob a denominação geral de biotecnologia, passaram a representar uma ferramenta valiosa para incrementar ganhos de produtividade.

A apresentação dos pormenores específicos da biotecnologia vegetal não é objetivo deste livro, mas suas finalidades gerais e suas ferramentas experimentais básicas serão, resumidamente, abordadas.

Os métodos modernos da biotecnologia permitem isolar e manipular genes específicos de interesse agronômico, como os que conferem resistência a pragas, a doenças e a herbicidas, tolerância a condições ambientais hostis ou que determinam características de valor socioeconômico. Esses métodos permitem também transferir genes de espécies selvagens para espécies cultivadas, superando as barreiras de cruzamento naturais existentes entre as espécies e reduzindo o tempo de obtenção de variedades realmente novas, com características que não tinham. As técnicas que compõem a biotecnologia são potencialmente aplicáveis à transferência de genes de qualquer organismo, seja ele vírus, bactéria, fungo, alga, animal ou qualquer vegetal não relacionado, a uma grande variedade de espécies de plantas. Até agora, essas técnicas já têm contribuído muito para elucidar os mecanismos moleculares básicos e para desvendar mecanismos genéticos que controlam importantes funções das células vegetais.

Entre as metodologias que mais avanços têm oferecido em termos de conhecimento científico ou do melhoramento genético vegetal, destacam-se: obtenção de protoplastos, cultura de tecidos e produção de plantas transgênicas.

▪ *Protoplastos*

O termo protoplasto é usado para definir células vegetais das quais a parede celular foi removida. Os protoplastos são sistemas adequados para procedimentos experimentais que não são possíveis com células intactas. Eles podem ser isolados de diferentes tecidos vegetais por separação mecânica, após digestão enzimática pela enzima celulase. Os protoplastos assim obtidos são muito frágeis e muito sensíveis a vírus e bactérias.

Protoplastos isolados de diferentes espécies podem ser manipulados com diversas finalidades. Eles permitem não só inoculações de vírus e bactérias, como também a introdução de DNA purificado (transfecção) e o preparo, por centrifugação fracionada, de componentes celulares como cloroplastos e vacúolos. A partir da cultura de protoplastos *in vitro*, pode haver a regeneração de plantas inteiras. Por outro lado, a fusão de protoplastos pode ser induzida para dar origem a células híbridas. A combinação das técnicas de isolamento e fusão de protoplastos com a técnica de regeneração de plantas inteiras permite a obtenção de plantas híbridas. Essa técnica é denominada de hibridação somática vegetal. Os híbridos somáticos apresentam, geralmente, núcleo e citoplasma híbridos, mas podem também apresentar núcleo de um genitor e citoplasma do outro, ou um citoplasma híbrido. Esta é uma técnica importante para a transferência de material genético em vegetais superiores. Mas, até o momento, só alguns poucos híbridos intra- e interespecíficos ou intergenéricos (envolvendo plantas de tabaco, colza, repolho, citros e batata) estão sendo utilizados com sucesso nos programas de melhoramento genético, dada a dificuldade de regenerar plantas inteiras a partir dos produtos de fusão.

▪ *Cultura de tecidos*

A cultura de tecidos é um processo pelo qual plantas inteiras, órgãos, fragmentos de tecido (explantes) obtidos de cau-

les, folhas e raízes e ainda células isoladas, quando cultivados assepticamente em meio nutritivo, dão origem a brotos, raízes ou mesmo plantas inteiras.

Geralmente, as células não mais se dividem depois que se tornam diferenciadas; mas as plantas, ao contrário dos animais, continuam a crescer ao longo de toda a sua vida.

Nos vegetais, a maior parte das divisões celulares se concentra em regiões com intensa e contínua atividade mitótica, conhecidas como meristemas, localizadas principalmente na extremidade das raízes e de partes aéreas. As células somáticas derivadas desses meristemas podem atingir estados diferentes de diferenciação ou de determinação. Elas podem reter o DNA funcional e conservado, de tal modo que os mecanismos de expressão gênica diferencial não provocam modificações permanentes durante a diferenciação. Essa característica é chamada de totipotência. Essas células permanecem em fases relativamente iniciais de desenvolvimento, como as células dos próprios meristemas e dos tecidos embrionários, e estão em um estado chamado de indeterminado. Por outro lado, outras células atingem um estado de desenvolvimento além do qual elas produzem diferentes tipos de células especializadas, como elementos do sistema vascular lignificado do xilema e floema e células suberizadas do córtex. Essas células são ditas determinadas. As células indeterminadas, dependendo das condições que lhe são impostas, são capazes de seguir diferentes vias metabólicas do desenvolvimento. É o que acontece com células não meristemáticas presentes em caules, raízes e folhas de muitas plantas, que podem ser estimuladas a se dividir, quando danificadas. Como toda célula vegetal indeterminada é totipotente, em condições adequadas ela é capaz de desdiferenciar-se e voltar a proliferar rapidamente.

Uma das consequências desse crescimento de células vegetais em cultura é o desenvolvimento de tecidos organizados ou meristemas que voltam a se rediferenciar em tipos celulares especializados, até originar novamente uma planta completa. Esse tipo de crescimento tem uma importante aplicação econômica e agronômica, pois permite que se obtenha, a partir de um pedaço de meristema, um número praticamente ilimitado de plantas, com as mesmas características genéticas da planta mãe, gerando, portanto, um clone vegetal. Isso foi conseguido com muitas espécies de interesse econômico, como a batata, o tabaco e a cenoura. Essa técnica de clonagem, também conhecida como micropropagação, é usada para o crescimento de muitas plantas ornamentais e cultivadas, para a obtenção de clones vegetais livres de doenças e é hoje uma importante ferramenta na engenharia genética. Esse processo pode ocorrer mesmo em células haploides, utilizando-se células imaturas do grão de pólen (microsporócito) que vão gerar plantas haploides, como é o caso do arroz e do fumo. Uma segunda consequência envolve o crescimento desorganizado de massas celulares conhecidas como calos, de células indiferenciadas com paredes delgadas e com grandes vacúolos. Células de calos podem manter-se nesse estado por longos períodos, se são rotineiramente repicadas para meio novo. Essas células podem também resultar em plantas regeneradas quando são tratadas com uma combinação adequada de fatores de crescimento vegetais. Isso já foi verificado com a cenoura, a batata e o fumo, por exemplo.

O crescimento das células e a regeneração de plantas em cultura são processos controlados por reguladores de crescimento, mas o mecanismo preciso desse controle é desconhecido, pois os seus efeitos sobre a expressão gênica não estão esclarecidos. Os fatores de crescimento dos vegetais pertencem a apenas cinco classes: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abásico e gás etileno. Todos têm peso molecular baixo (abaixo de 500 dáltons), o que lhes permite atravessar a parede celular. Apesar do seu pequeno número, a ação simultânea de vários desses fatores em proporções variáveis, bem como a sua ação combinada com pequenas moléculas, diversifica os seus efeitos. Por exemplo, quando a auxina age simultaneamente com a citocinina, acelera a formação de gemas; já a ação da auxina determina a formação de raízes e a diferenciação dos vasos condutores (floema e xilema).

Produção de plantas transgênicas

Planta transgênica é aquela que contém, além dos genes naturais, um ou mais genes adicionais provenientes de outro organismo, que pode ser uma planta, uma bactéria, ou até um animal. O isolamento e a transferência do(s) gene(s) de interesse geralmente envolvem as *técnicas do DNA recombinante*, que estão descritas no Capítulo 8. Quaisquer que sejam as técnicas utilizadas, elas devem garantir que os genes introduzidos consigam se integrar de forma estável ao genoma da planta e que os produtos gênicos se expressem de maneira hereditária. Uma vez inserido o gene na célula vegetal, essa célula transformada, ou um grupo delas, é estimulada a regenerar uma nova planta. Em razão das condições hormonais, nutricionais e ambientais exigidas por cada uma das espécies vegetais para se regenerar, a produção de plantas transgênicas não pode ser usada ainda hoje em todas as suas potenciais finalidades. A utilização dessa tecnologia certamente ultrapassa o interesse agronômico, atingindo as mais diversas áreas da indústria e da saúde humana e animal. Os benefícios e os riscos da generalização do uso de plantas transgênicas constituem, nos dias de hoje, um assunto polêmico mundialmente discutido. Somente o acúmulo e a ampla divulgação do conhecimento científico acerca do assunto poderão romper as resistências e a oposição que normalmente surgem com o desenvolvimento de novas tecnologias.

Resumo

Os vegetais superiores são constituídos por células eucariontes, com a organização típica consistindo em núcleo e citoplasma rico em endomembranas e muito semelhantes às células eucariontes animais.

No entanto, as células das plantas contêm determinados componentes exclusivos. Além da membrana plasmática, elas apresentam paredes rígidas que lhes conferem forma constante e proteção contra agressões mecânicas e contra ruptura

por desequilíbrio osmótico. Apresentam grandes vacúolos citoplasmáticos que podem ocupar até 95% do volume total da célula e desempenhar importantes funções, como a de manter a turgescência celular.

A parede celular se forma, na citocinese, pela fusão de vesículas originadas dos dictiossomos e pela posterior deposição de camadas dessa parede. Paredes que são capazes de crescer são chamadas de paredes primárias. Quando o crescimento para, deposita-se a parede secundária. O citosol de células adjacentes permanece contínuo por causa da presença de canais através das paredes celulares, chamados plasmodesmos. A biogênese da parede depende da biossíntese de seus componentes. A síntese da celulose tem lugar em um complexo enzimático integrante da membrana plasmática, chamado sintase de celulose. Todos os outros polímeros da parede são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso (parte polipeptídica das glicoproteínas) ou no complexo de Golgi (parte glicídica e polissacarídios) e, então, são exportados para a parede por meio de vesículas de secreção. A biossíntese de novos componentes também ocorre durante o alongamento celular, que é um crescimento induzido pela pressão de turgor celular, direcionado pela disposição das fibrilas de celulose e regulado por hormônios. Os componentes do citoesqueleto participam de vários processos, alguns específicos das células vegetais, como a ciclose e a deposição de precursores da parede celular.

Outra característica das células vegetais é a presença de plastos, classificados de acordo com o pigmento que neles predomina ou com o material de reserva que armazenam. Plastídeos e mitocôndrias são organelas envolvidas por dupla membrana, semiautônomas, que contêm seu próprio DNA mas que importam a maioria de suas proteínas do citosol. Os cloroplastos, que contêm clorofila, são responsáveis pela fotossíntese. Por meio desse processo, pigmentos associados a proteínas integrais das membranas dos tilacoides dos cloroplastos absorvem luz solar, cuja energia é capturada na forma de ligações químicas. Nas plantas, existem dois tipos de complexos pigmentos-proteínas: fotossistema I e fotossistema II, que, normalmente, funcionam em série. Ao realizarem um transporte de elétrons não cíclico, eles oxidam água a oxigênio molecular, processo pelo qual é fornecido quase todo o oxigênio da atmosfera, e reduzem $NADP^+$ a NADPH. Nesse transporte de elétrons, forma-se um gradiente de prótons através da membrana do tilacoide, que é usado para a síntese do ATP no complexo CF_1. NADPH e ATP formados por essas reações fotodependentes fornecem a energia para a redução do dióxido de carbono nas reações bioquímicas. Por essas reações, o CO_2 atmosférico é fixado em compostos que são convertidos a carboidratos, via ciclo de Calvin. Esse ciclo envolve uma série de reações que ocorrem no estroma. Os carboidratos sintetizados são convertidos em formas armazenáveis de energia: sacarose e amido, sintetizados no citosol e no cloroplasto, respectivamente. A principal enzima que catalisa a fixação do carbono, a RUBISCO, também age como oxigenase, desencadeando reações conhecidas como fotorrespiração, que reduzem a eficiência da fotossíntese e das quais participam os peroxissomos. A perda pela fotorrespiração é evitada, em algumas plantas, por mecanismos que concentram CO_2 nos locais de carboxilação dos cloroplastos. Esses mecanismos incluem o ciclo do carbono de plantas C_4 e o metabolismo MAC.

Muitas características vegetais de interesse econômico são hoje mais facilmente selecionadas, estudadas e reproduzidas por meio do uso de técnicas modernas. A engenharia genética, uma subárea da tecnologia do DNA recombinante, compreende a transferência de genes de um organismo a outro, originando organismos transgênicos. A inserção de DNA estranho em genomas de plantas pode ocorrer via DNA de bactérias ou de vírus, via manipulação mecânica ou por fusão de protoplastos. O cultivo de células vegetais, cujo genoma contém genes transferidos, pode regenerar plantas transgênicas.

Bibliografia

Albersheim, P. The walls of growing plant cells. *Scientific American*, 232:80, 1975.

Berkaloff, A. Bourguet, J., Favard, P. *et al. Biologia y Fisiologia Celular III. Cloroplastos, Peroxisomas, División Celular*. Ediciones Omega, 1984.

Carpita, N.C. e Gibeaut, D.M. Structural models of primary cell wall in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3:1, 1993.

Culotta, E. Will plants profit from high CO_2? *Science*, 268:654, 1995.

Cosgrove, D.J. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 6: 850, 2005.

Dornelas, M.C. e Vieira, M.L.C. A Fusão de Protoplastos como um Recurso Auxiliar ao Melhoramento Genético Vegetal. Sociedade Brasileira de Genética, *Série Monografias*, nº 3:163, 1996.

Elliott, W.H. e Elliott, D.C. *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford Univ. Press, 1997.

Gander, E.S. e Marcellino, L.H. Plantas Transgênicas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 1:34, 1997.

Gibeaut, D.M. e Carpita, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *The FASEB Journal*, 8:904, 1994.

Gould S.B., Waller R.F. e McFadden G.I. Plastid Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:491-517, 2008.

Jones, M.G.K. e Lindsey, K. Chapter 7: Plant Biotechnology. *In*: Walker, J.M. e Gingold, E.B. eds. *Molecular Biology and Biotechnology*, 3rd ed. Royal Society of Chemistry, pp. 123-154, 1993.

Kerbauy, G.B. Clonagem de Plantas *in vitro*: Uma realidade. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 1:30, 1997.

Mantell, S.H., Matthews, J.A. e McKee, R.A. *Princípios de Biotecnologia em Plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas*. Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

Moore, R., Clark, W.D. e Vodopich, D.S. *Botany*. 2nd ed. WCB/McGraw-Hill, 1998.

Raven, P.H., Evert, R.F. e Eichhorn, S.E. *Biologia Vegetal*, 5ª ed. Guanabara Koogan, 1996.

Robards, A.W. e Pitts, J.D. Parallels in Cell to Cell Communication in Plants and Animals. *In*: Neuhoff, V. e Friend, J. eds. *Cell to Cell Signals in Plants and Animals*. Springer-Verlag, 1991.

Roberts, K. The plant extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 6:688, 1994.

Somerville, C. Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22:53-78, 2006.

Taiz, L. e Zeiger, E. *Plant Physiology*, 2nd ed. Sinauer, 1998.

14 Células Procariontes

Roteiro

- As células procariontes não apresentam envoltório nuclear nem o elaborado sistema de membranas encontrado no citoplasma das células eucariontes, tampouco citoesqueleto
- São as células mais antigas na Terra
- Todas as bactérias são constituídas por células procariontes
- Após multiplicação do genoma, as células procariontes se dividem por fissão binária (não há mitose)
- Muitas bactérias contêm moléculas circulares de DNA extracromossômico, as quais apresentam informação genética útil à bactéria, porém, não essencial à vida da célula. Esses minicromossomos, denominados plasmídios, são muito utilizados em biotecnologia para transferir genes entre bactérias
- Exceto as bactérias do grupo dos micoplasmas, as demais apresentam uma parede protetora rígida, responsável pela forma da célula
- Pelas características de suas paredes, as bactérias podem ser gram-positivas ou gram-negativas, conforme se corem ou não pelo corante de Gram
- Os diversos grupos de bactérias apresentam grande diversidade metabólica e podem ser encontradas nos *habitats* mais variados
- As bactérias patógenas (causadoras de doenças) podem produzir endotoxinas e exotoxinas
- Os esporos são formas de resistência de determinados tipos de bactérias
- A transferência de material genético (DNA) entre células procariontes pode ser feita por transformação, conjugação e transdução
- Os flagelos das células procariontes se movimentam por rotação, graças a um fluxo de prótons
- Os micoplasmas são as bactérias mais simples
- As cianobactérias são fotossintéticas, e algumas produzem NH_3 (amônia), podendo sobreviver à custa apenas de luz, N_2, CO_2 e H_2O.

As bactérias são células procariontes, que constituem os menores seres vivos e os mais simples do ponto de vista estrutural. A limitação do tamanho provavelmente se deve à inexistência de compartimentos intracelulares separados por membranas. Um elaborado sistema de membranas forma compartimentos funcionais nas células eucariontes, facilitando o fluxo e a concentração de moléculas e íons, enquanto, nas procariontes, as substâncias ficam dispersas no citoplasma. Não obstante sua simplicidade estrutural, do ponto de vista bioquímico e metabólico, as bactérias são seres complexos e diversificados, o que permite sua adaptação em *habitats* variados. Assim, elas são encontradas em todos os locais da Terra e no interior ou na superfície do corpo dos seres pluricelulares. Embora algumas bactérias causem doenças, a maioria é inofensiva e muitas são benéficas.

A forma das bactérias é diversificada. As esféricas são chamadas cocos; quando alongadas, recebem o nome de bacilos; e, em formas helicoidais, em geral móveis, são denominadas espirilos. Muito frequentemente, as células bacterianas aparecem em grupos, e não isoladas. Os cocos em pares formam os diplococos; dispostos em fileiras são chamados estreptococos; e, quando aparecem como cachos de uvas, denominam-se estafilococos.

A estrutura das bactérias é simples apesar de sua diversidade e complexidade metabólica

O estudo da estrutura das bactérias (Figura 14.1) mostra que elas apresentam uma membrana plasmática que envolve seu citoplasma; em torno dessa membrana se encontra uma espessa e rígida camada, a parede bacteriana, em torno da qual pode ocorrer uma terceira camada, viscosa, que, em algumas espécies, é espessa, constituindo a cápsula. No interior da célula procarionte, além do citoplasma, encontra-se uma região correspondente ao núcleo, chamada nucleoide, bem como grânulos diversos. Frequentemente, partem da superfície bacteriana prolongamentos filamentosos de dois tipos (Figura 14.1): os flagelos, responsáveis pela movimentação das bactérias, e as fímbrias, estruturas que participam da transferência unidirecional de DNA entre células bacterianas.

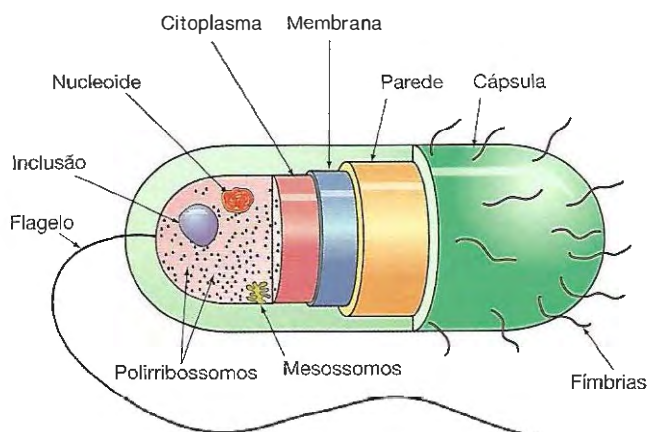



Figura 14.1 ▪ Desenho tridimensional mostrando as estruturas principais da bactéria. Observe que o flagelo apresenta, em sua base, uma dilatação que corresponde ao gancho e ao "rotor". O nucleoide está relacionado com uma dobra da membrana plasmática.

A membrana plasmática (Figura 14.2) das bactérias tem a mesma estrutura trilaminar da membrana plasmática das células eucariontes. Nela, situam-se moléculas receptoras, as proteínas relacionadas com o transporte transmembrana e as moléculas da cadeia respiratória análoga à cadeia respiratória existente na membrana interna das mitocôndrias das células eucariontes.

Às vezes, observam-se invaginações da membrana, formando um complexo denominado mesossomo (*meso*, meio, e *soma*, corpo). Essas estruturas (Figura 14.1) aumentam a quantidade de membrana plasmática, elevando também o número de moléculas que participam de processos funcionais importantes, como a respiração. Os mesossomos também participam da formação dos septos e da parede, que aparecem quando a bactéria se divide.

Cada bactéria contém um ou mais nucleoides, regiões arredondadas ou alongadas bem visíveis nas micrografias eletrônicas. O nucleoide (Figura 14.3) contém o cromossomo da bactéria e, muitas vezes, localiza-se nas proximidades ou mesmo ligado à membrana plasmática (Figuras 14.1 e 14.4). O DNA do cromossomo bacteriano é um filamento circular, constituído por duas cadeias dispostas em hélice, mede cerca de 1 mm de comprimento e sua molécula se dobra muito para caber na célula bacteriana (trata-se de uma molécula *supercoiled*). O cromossomo bacteriano é diferente dos cromossomos das células eucariontes, que são estruturas muito mais elaboradas e constituídas de DNA e maior variedade de proteínas. Em uma mesma espécie bacteriana, o número de cromossomos, por célula, é variável, porém geralmente existe mais de um. Como as bactérias não se dividem por mitose, seus cromossomos não apresentam a condensação cíclica observada

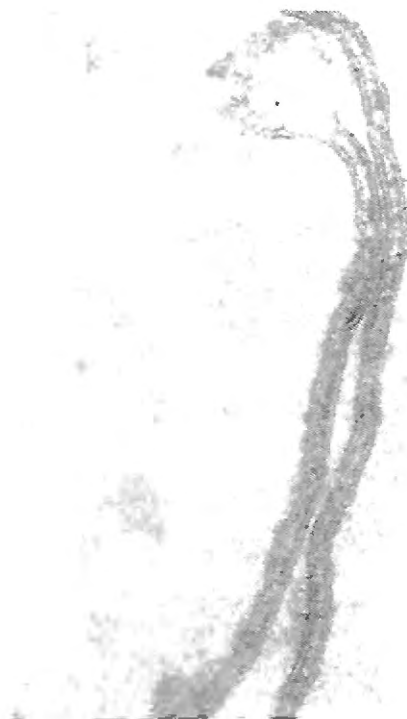



Figura 14.2 ▪ Eletromicrografia de cortes da membrana plasmática da bactéria *Escherichia coli* isolada por centrifugação fracionada. Note que essa membrana plasmática é semelhante às unidades de membrana, trilaminares, das células eucariontes. Aumento de 175.000×. (Cortesia de J.A. Serrano, Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade de Los Andes, Merida, Venezuela.)

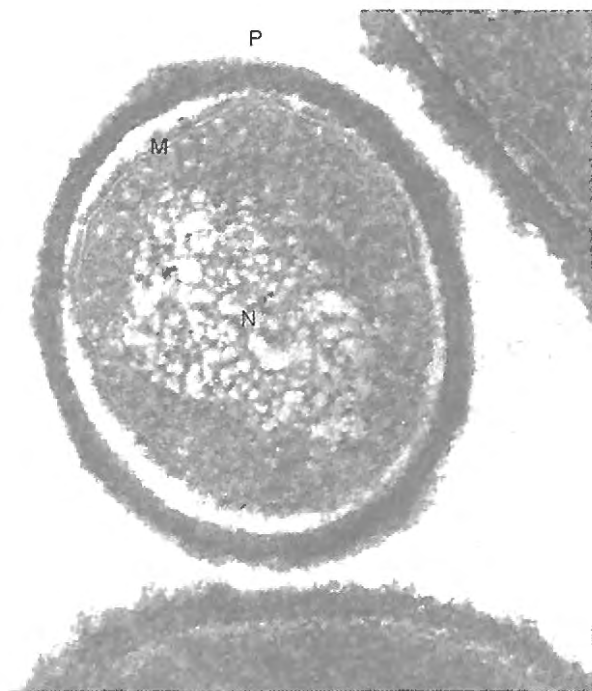



Figura 14.3 ▪ Micrografia eletrônica de corte de bactéria. Observe a parede (**P**), a membrana plasmática (**M**) e o nucleoide (**N**). O espaço entre a membrana e a parede é um artefato, em razão da retração da célula durante a realização do preparado.

nos cromossomos das células eucariontes durante a divisão celular. Não existe ciclo celular nas bactérias.

Além dos cromossomos do nucleoide, as bactérias podem apresentar outros, também circulares, muito menores. Esses pequenos cromossomos, localizados fora do nucleoide, também veiculam informação genética e são denominados plasmídios. Os plasmídios se multiplicam independentemente dos cromossomos principais. Esses elementos contêm genes para a própria replicação e genes que influenciam favoravelmente a bactéria; todavia, não são essenciais para a vida dela. Os plasmídios geralmente ocorrem em cópias múltiplas, o que aumenta muito a eficiência dos genes neles contidos. Um plasmídio capaz de se integrar no cromossomo da bactéria recebe o nome de epissomo.

Os plasmídios apresentam características que os tornam muito úteis aos estudos de biologia molecular, sendo muito utilizados nas técnicas de DNA recombinante (engenharia genética) para transferir genes entre organismos diferentes. Ao lado dos genes dos vírus e dos transpósons, os plasmídios são genes dotados de mobilidade. Na natureza, como será estudado adiante neste capítulo, as bactérias podem passar os genes contidos nos plasmídios de umas para outras, fato muito significante para a sobrevivência dessas células.

Assim como nas eucariontes, também nas células procariontes pode haver transferência de genes para locais diferentes no DNA da mesma célula, pelos transpósons, que são segmentos de DNA dotados da capacidade de se transferirem entre plasmídios e cromossomos, "saltando" de um local para outro. Os transpósons aumentam as variações genéticas entre as bactérias, facilitando muito a transferência de resistência a antibióticos e a outras substâncias tóxicas para elas. Essa propriedade aumenta muito a sobrevivência das bactérias, quando elas enfrentam condições adversas. Tanto nas bactérias como nos demais seres vivos, os transpósons são elementos importantes no processo evolutivo.

Todas as bactérias, exceto os micoplasmas, apresentam uma parede (Figura 14.4) rígida, responsável pela forma da célula e que a protege contra a ruptura e contra a penetração de bacteriófagos (bacteriófago é o nome dado aos vírus que atacam as bactérias). Pelo transporte ativo de moléculas e íons, a maioria das bactérias mantém pressão osmótica interna de 5 a 20 atmosferas, muito mais elevada do que a pressão osmótica de determinados ambientes onde elas vivem na natureza. A parede impede que essas bactérias se rompam, possibilitando sua sobrevivência e multiplicação em meio hipotônico (ambiente com pressão osmótica inferior à do citoplasma bacteriano). Apesar de ser rígida e resistente, a parede é permeá-

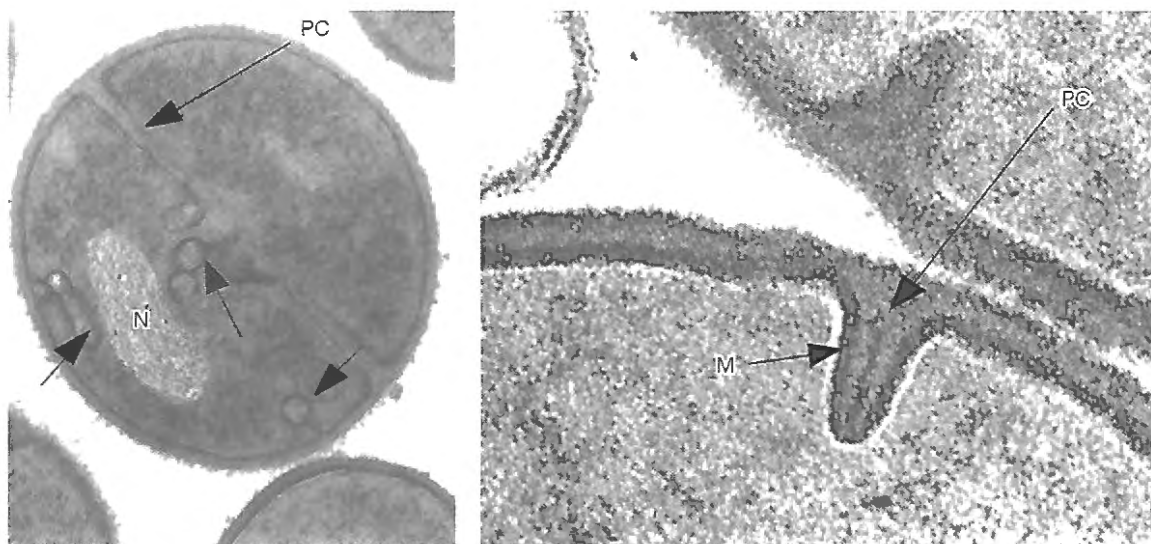



Figura 14.4 ▪ Eletromicrografias de cortes da bactéria *Staphylococcus aureus* em fase de divisão. Note a parede celular (**PC**), formando um septo que irá dividir a bactéria. Abaixo da parede celular, a membrana plasmática (**M**). O nucleoide (**N**) aparece com o seu aspecto filamentoso característico, devido ao DNA. Na micrografia da esquerda, a seta sem letra indicativa mostra um mesossomo. *À esquerda*, em pequeno aumento. *À direita*, aumento de 110.000×. (Cortesia de T.J. Popkin, T.S. Theodore e R.M. Cole. *J. Bact.*, *107*:907, 1971. Reprodução autorizada.)

vel, o que é essencial para a nutrição da célula e a eliminação de moléculas diversas produzidas pelas bactérias. A parede contém moléculas antigênicas (capazes de provocar uma resposta imunitária e de reagir com os respectivos anticorpos produzidos nos organismos hospedeiros). Essas moléclas antigênicas das paredes podem ser utilizadas para a identificação das bactérias.

Em virtude das propriedades de suas paredes, as bactérias são divididas em dois grandes grupos: as gram-positivas e as gram-negativas. A classificação de um determinado tipo de bactéria em um desses grupos depende de seu comportamento diante da coloração de Gram. As bactérias que, após aplicação da técnica de Gram, aparecem coradas em roxo são chamadas gram-positivas; as que não retêm a cor roxa são as gram-negativas. Para facilitar sua visualização ao microscópio, as últimas são geralmente coradas em vermelho com safranina ou fucsina, que não altera a cor roxa das gram-positivas.

A parede das células gram-positivas é simples, sendo formada apenas por uma espessa camada de peptidoglicanas (sinônimos: mureína, mucopeptídio) situada entre a membrana plasmática e a cápsula, que fica mais externamente. As peptidoglicanas são compostos típicos das paredes bacterianas, constituídos por cadeias de aminoácidos ligadas a uma cadeia de hidratos de carbono. São responsáveis pela rigidez e pela resistência da parede das bactérias. A parede das células gram-positivas geralmente contém moléculas de ácidos teicoicos. Esses ácidos são polímeros constituídos de vários tipos de moléculas como glicerol, hidratos de carbono e aminoácidos.

A parede das bactérias gram-negativas é muito complexa (Figura 14.5), sendo formada pelas seguintes camadas, de dentro para fora: (1) uma camada de peptidoglicanas, mais delgada do que a das bactérias gram-positivas; (2) uma camada de lipoproteínas; (3) a membrana externa, de estrutura trilaminar, como as das demais membranas celulares; e (4) a camada de lipopolissacarídios (LPS).

A membrana externa é uma estrutura peculiar. Embora localizada na parte externa da parede, tem estrutura semelhante às membranas celulares em geral. A membrana externa tem a

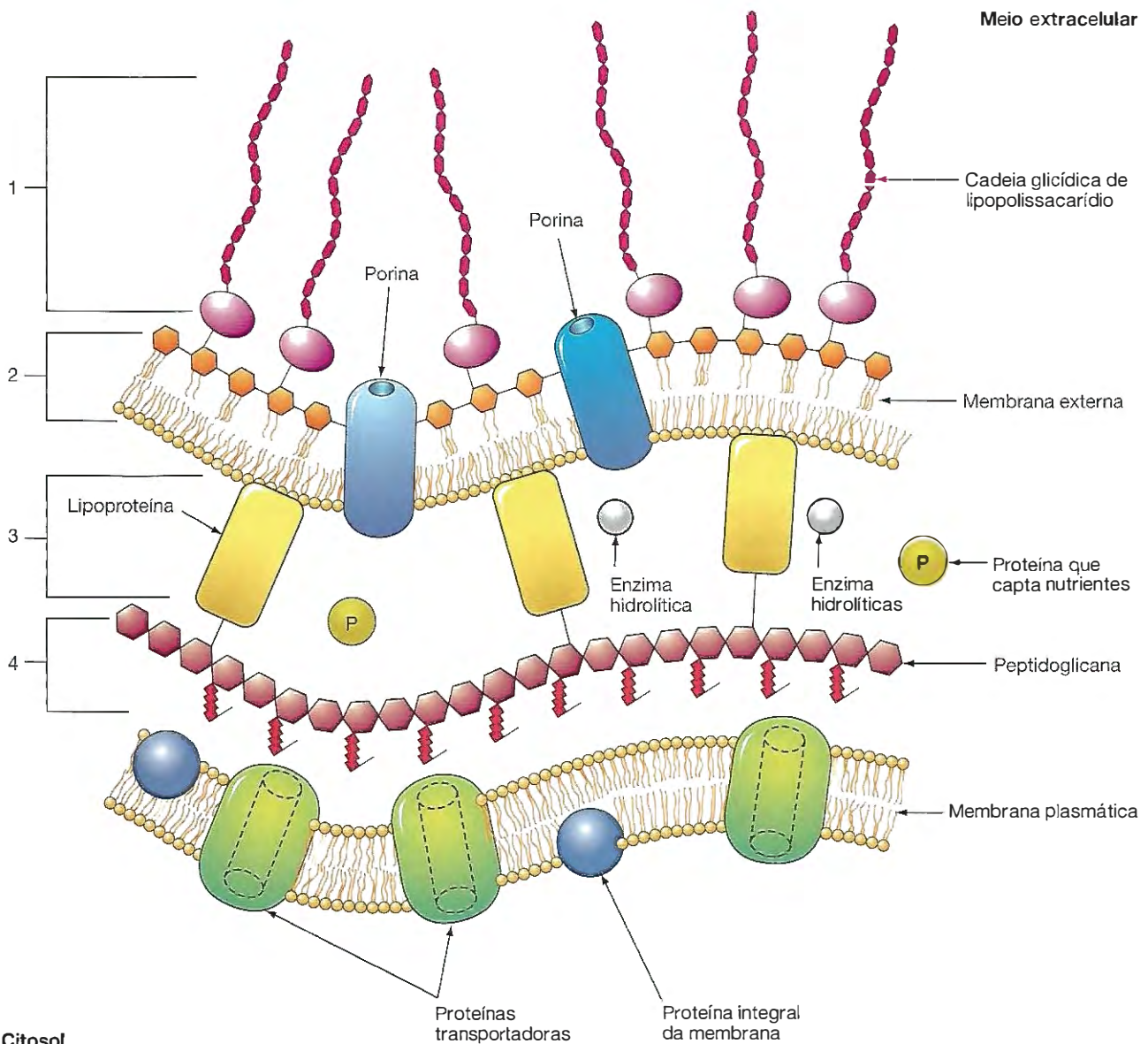



Figura 14.5 ▪ Estrutura molecular da parede das bactérias gram-negativas. Essas paredes têm quatro camadas: **1.** uma delgada camada de peptidoglicana; **2.** uma camada de lipoproteínas, que se prende, de um lado, às peptidoglicanas e, do outro, aos lipídios da membrana externa; **3.** a membrana externa; e **4.** a camada de lipossacarídios, ligada à membrana externa. Observe que essa parede contém, na camada 2, proteínas (P) que captam nutrientes e enzimas hidrolíticas que degradam as moléculas captadas.

arquitetura de um mosaico fluido, mas os fosfolipídios de seu folheto externo são substituídos por abundantes moléculas de lipopolissacarídios (LPS), que chegam a constituir uma verdadeira camada, formando uma forte barreira em volta da célula. Entre outras funções, os lipopolissacarídios têm um papel protetor, como, por exemplo, nas bactérias entéricas que resistem às enzimas hidrolíticas e aos sais biliares do trato digestivo. A membrana externa das bactérias gram-negativas contém moléculas proteicas, denominadas porinas, que formam canais pelos quais penetram diversas substâncias, como aminoácidos e hidratos de carbono. Como a camada de lipopolissacarídios é impermeável, praticamente todas as moléculas que penetram na parede, para atingirem a membrana plasmática, o fazem pelos canais de porinas.

A cápsula, encontrada em muitas bactérias (Figura 14.1), tanto gram-positivas como gram-negativas, é uma camada de espessura e constituição molecular variadas e de consistência mucosa. Costuma conter antígenos potentes, conferindo à bactéria propriedades imunológicas muito definidas. Apesar de a presença da cápsula não estar sempre relacionada com a capacidade da bactéria em agredir o hospedeiro, essa estrutura confere às bactérias patogênicas (*pathos*, doença, e *genos*, gerar) certa resistência à fagocitose e ao ataque de outros elementos de defesa do organismo, explicando assim, em parte, sua atividade patogênica.

A hidrólise da parede bacteriana ou o bloqueio de sua síntese podem gerar os protoplastos ou os esferoplastos. A remoção da parede deve ser feita em meio de cultivo de pressão osmótica adequada, para prevenir a ruptura das células sem parede. Geralmente, os protoplastos são derivados das bactérias gram-positivas, e os esferoplastos, das gram-negativas. Ambos são esféricos. A principal diferença entre os dois é que os protoplastos são totalmente desprovidos de constituintes da parede e, por isso, osmoticamente muito mais frágeis do que os esferoplastos, que retêm algum material da membrana externa da parede bacteriana.

As células desprovidas de parede e que são capazes de proliferar nos cultivos ou nos organismos hospedeiros recebem o nome de **formas L**. Algumas dessas formas L podem voltar a sintetizar paredes, revertendo à sua forma normal. Outras perdem definitivamente a capacidade de voltar a fabricar novas paredes.

Determinadas bactérias produzem formas L espontaneamente, muitas vezes causando doenças crônicas e de tratamento difícil, porque as formas L são mais resistentes a muitos antibióticos.

Sendo desprovido de organelas membranosas, o citoplasma das células bacterianas é formado essencialmente pelo citosol, contendo moderada quantidade de ribossomos, que se prendem a moléculas de RNA mensageiro (mRNA) para formar polirribossomos. Nas bactérias fotossintéticas, o pigmento captador da luz solar se localiza em lamelas paralelas situadas próximo à membrana plasmática e que, às vezes, dobram-se e formam corpúsculos isolados.

As bactérias podem acumular material de reserva em grânulos osmoticamente inertes, não envolvidos por membrana. Na falta de nitrogênio, quando não podem sintetizar proteínas nem ácidos nucleicos, as bactérias acumulam o carbono excedente sob a forma de polímeros do ácido hidroxibutírico ou de polímeros de glicose, como o amido e o glicogênio. Esses grânulos são usados como fonte de carbono para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, quando as células obtêm nitrogênio suficiente. São muito frequentes os grânulos de metafosfato polimerizado, que foram denominados grânulos de volutina, antes de sua caracterização química.

As células procariontes não apresentam citoesqueleto, ao contrário das células eucariontes, que exibem um citoesqueleto responsável pela constituição e manutenção da forma das células e que participa dos movimentos celulares. A forma das células das bactérias é determinada pela parede, que é uma estrutura rígida.

Determinadas bactérias fotossintéticas (utilizam a luz do sol como fonte de energia) que vivem em meio aquático apresentam vesículas cilíndricas que contêm gás, as quais controlam a flutuação do microrganismo. Essas vesículas alongadas são limitadas por membranas proteicas e, portanto, diferentes das membranas em geral, em que predominam lipídios. Por meio do controle de sua flutuação, essas bactérias procuram, no meio líquido, a profundidade mais conveniente no que se refere à concentração de nutrientes, concentração de oxigênio e intensidade luminosa.

Os prolongamentos observados na superfície das bactérias são de dois tipos – os flagelos e as fímbrias (Figura 14.1). Os flagelos são órgãos de locomoção filamentosos, medindo geralmente de 3 a 12 μm de comprimento e 12 a 30 nm de diâmetro (Figura 14.6); porém, em determinadas bactérias, o flagelo pode atingir algumas centenas de micrômetros de comprimento. Na base do flagelo existe uma dilatação, principal responsável pela rotação do flagelo, que se encontra imersa na parede e na membrana plasmática da célula bacteriana. O flagelo é um polímero

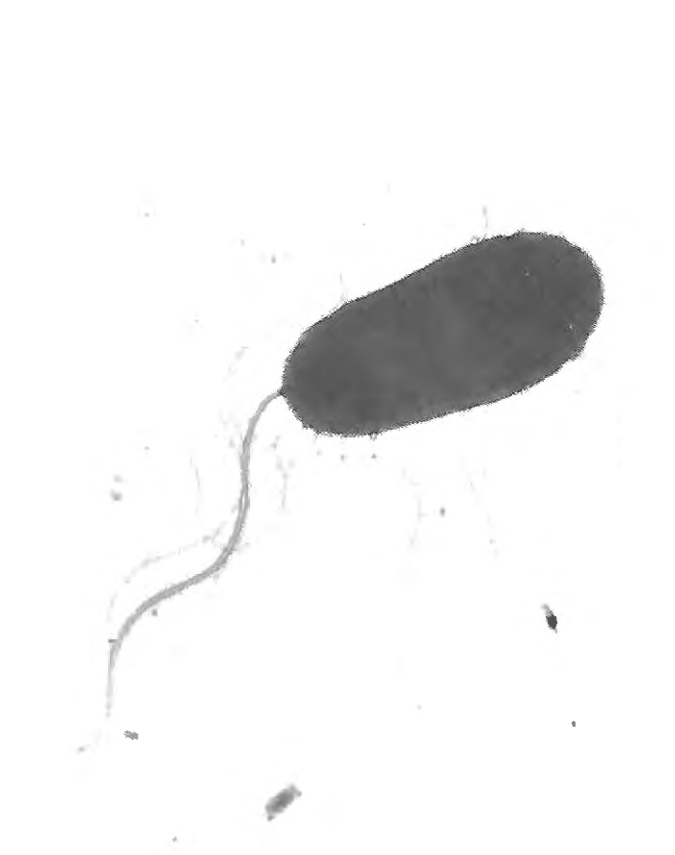



Figura 14.6 ▪ Eletromicrografia de preparado total da bactéria *Benechea parahemolytica* mostrando um flagelo polar, mais grosso, e vários outros flagelos mais finos. (De R.D. Allen e P. Bauman. *J. Bact.*, *107*:295, 1971. Reprodução autorizada.)

da proteína flagelina, característica de cada espécie de bactéria. Os monômeros de flagelina se organizam em 11 protofilamentos para constituir o flagelo.

Não há indícios de que o ATP participe do movimento flagelar. Os dados disponíveis sugerem que a energia é fornecida por um fluxo de prótons. Os flagelos são rotores semirrígidos aos quais a célula imprime um movimento de rotação. O flagelo pode girar em um sentido algum tempo e, em seguida, girar no sentido contrário, alterando a direção do movimento bacteriano.

As fímbrias (Figura 14.7) são filamentos rígidos, de natureza proteica, mais numerosos do que os flagelos e não associados à locomoção. As fímbrias são mais finas e mais curtas do que os flagelos. Como estes, as fímbrias também são compostas de subunidades proteicas. Há duas classes de fímbrias: as fímbrias comuns, que podem promover a aderência das bactérias às células eucariontes agredidas, tendo assim relevante papel na patogenicidade (capacidade de produzir doença) bacteriana, e as fímbrias sexuais, mais longas, que são responsáveis pela fixação das bactérias durante o processo de conjugação, que será estudado mais adiante. Nesse processo, há passagem unidirecional de DNA da célula bacteriana doadora para a célula receptora, por meio de comunicações que se formam entre os citoplasmas das duas células (não por dentro das fímbrias). As fímbrias sexuais estão presentes apenas nas bactérias doadoras, enquanto as células receptoras apresentam, na sua superfície, macromoléculas que facilitam a fixação das fímbrias. O papel das fímbrias sexuais é apenas fixar temporariamente a célula doadora e a receptora.

A Figura 14.8 resume as funções dos principais componentes de célula bacteriana.

O metabolismo bacteriano é muito diversificado

Possivelmente, não existe grupo de ser vivo que tenha metabolismo mais diversificado do que as bactérias. Bactérias diferentes podem utilizar como fonte de carbono e de energia os nutrientes mais diversos, e muitas vivem melhor em temperaturas extremas.

Algumas bactérias vivem em baixas temperaturas, enquanto outras estão adaptadas a temperaturas incompatíveis com a vida da maioria das células. É o caso das bactérias termofílicas, como a espécie *Thermus aquaticus*, que prolifera em temperatura superior a 70°C. A enzima polimerase dessa bactéria é empregada na técnica PCR (*polymerase chain reaction*), muito utilizada na caracterização do DNA para fins de pesquisa, na identificação de pessoas e em medicina forense (Capítulo 2). Outras bactérias vivem em *habitats* muito frios, sendo um exemplo a bactéria *Polaromonas vacuolata*, que prolifera melhor na temperatura de 4°C, não se multiplicando bem em temperaturas acima de 12°C, enquanto as bactérias mais comuns e mais estudadas proliferam nas temperaturas de 37 a 39°C.

A capacidade de utilizar numerosos nutrientes como fonte de carbono e de energia e a resistência a temperaturas muito diversas explicam a distribuição universal das bactérias, que são encontradas nos ambientes mais variados, como nos diferentes tipos de solo, na água salgada dos mares, na água doce dos rios e lagos, bem como no intestino e sobre a pele dos animais. Praticamente, não existem nichos ecológicos desprovidos de bactérias. Elas têm sido encontradas nas águas geladas dos polos e nas fontes naturais de água quente.

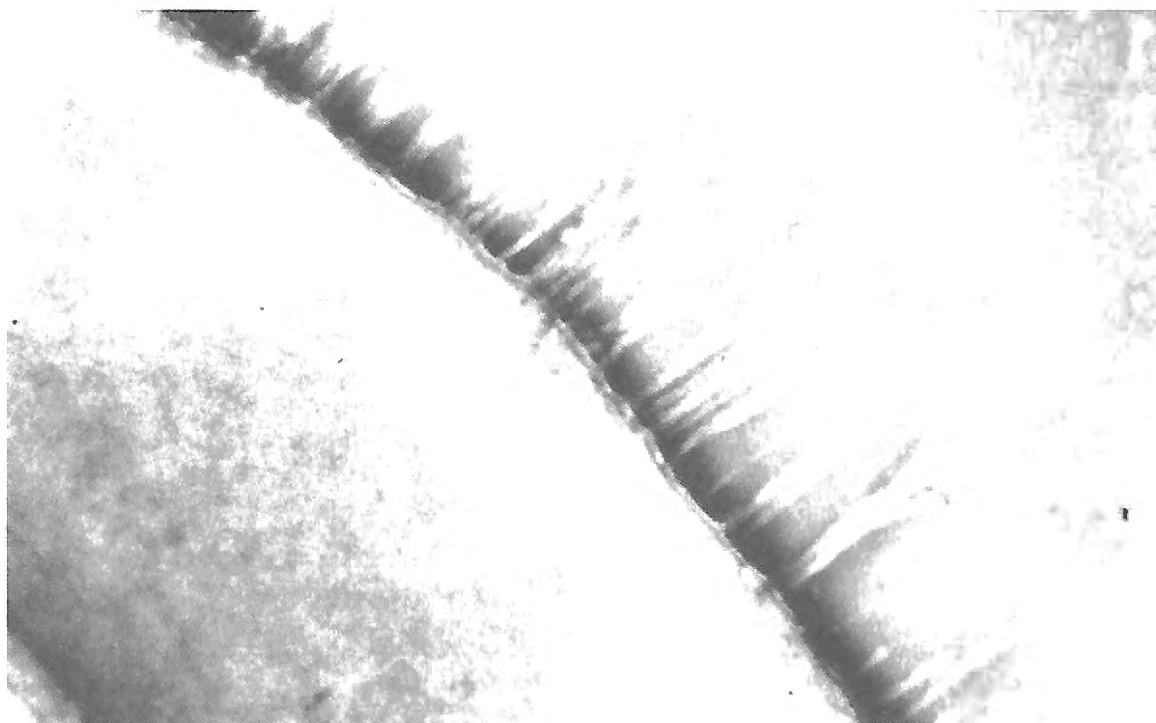



Figura 14.7 ▪ Eletromicrografia de bactéria mostrando numerosas fímbrias, que são prolongamentos da superfície celular. "Coloração" negativa. Aumento de 120.000×. (Cortesia de J.A. Serrano, Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade de Los Andes, Merida, Venezuela.)

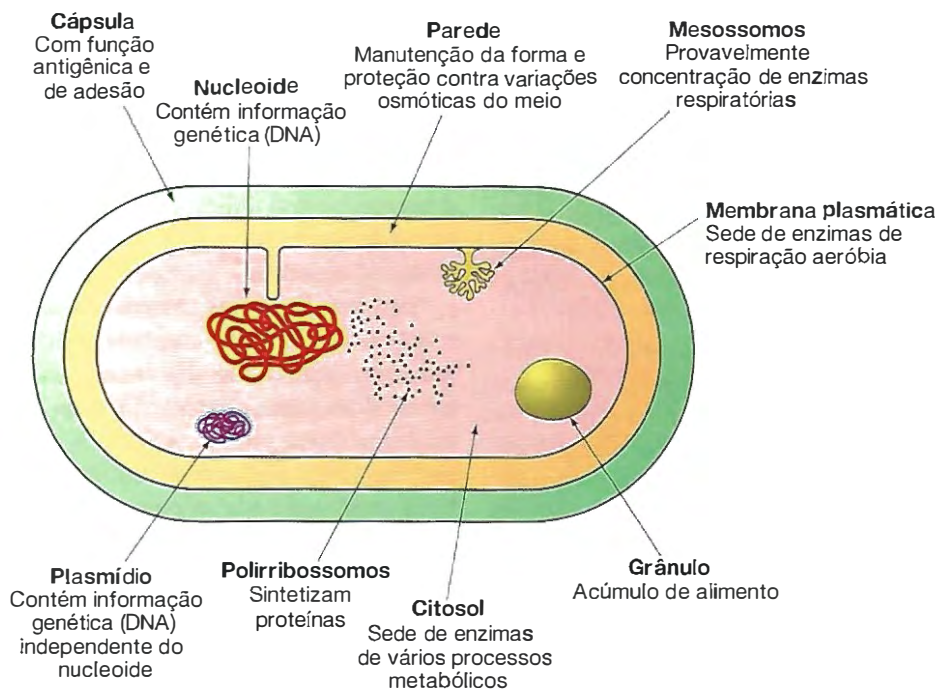



Figura 14.8 ▪ Desenho esquemático ilustrando as funções dos principais componentes de uma célula bacteriana.

Do ponto de vista metabólico, as bactérias podem ser divididas em fototróficas (*photos*, luz, e *trophe*, nutrição), quando utilizam a luz solar como fonte de energia, e quimiotróficas, quando utilizam a energia presente em compostos químicos.

No segundo grupo, se o composto doador de energia é inorgânico, as bactérias são quimiolitotróficas. Quando o composto é orgânico, a bactéria é chamada quimiorganotrófica.

As bactérias quimiorganotróficas mais exigentes só proliferam nos meios de cultura que contêm hidratos de carbono, aminoácidos e determinadas vitaminas. Essas bactérias obtêm a energia necessária para a sua vida por meio da oxidação de hidratos de carbono, gorduras e proteínas. Algumas, porém, retiram energia da decomposição anaeróbia (fermentação) dos hidratos de carbono (bactérias anaeróbias). Costuma-se chamar de anaeróbias facultativas às bactérias que podem viver tanto em meio aeróbio (com oxigênio) como anaeróbio (sem oxigênio). As bactérias quimiorganotróficas aeróbias têm metabolismo muito parecido com o da maioria das células animais (eucariontes). Os hidratos de carbono são muito utilizados por essas bactérias como fonte de energia.

A capacidade de metabolizar determinados tipos de açúcares, aliada à morfologia e afinidade das bactérias pelos corantes, é critério usado para a identificação e classificação laboratorial desses microrganismos. Componentes dos flagelos, da cápsula e da parede são antígenos (antígeno é uma molécula que promove a síntese de um anticorpo específico; Capítulo 2) que fornecem as bases para a análise imunológica, também importante para a identificação das bactérias.

O estudo do DNA bacteriano por meio de técnicas modernas promoveu informações mais seguras e de obtenção mais rápida, de grande importância para a identificação e a classificação das bactérias. A análise da sequência de nucleotídios no DNA possibilitou a descoberta de numerosas espécies novas e levou os pesquisadores a admitirem que há ainda muitas outras a serem descobertas, principalmente no solo.

Vários tipos de bactérias contêm como componentes de sua estrutura, ou liberam para o meio de cultura, substâncias tóxicas, que recebem o nome de endotoxinas e exotoxinas bacterianas (Tabela 14.1). Essas toxinas são, em parte, responsáveis pelos danos causados pelas bactérias aos organismos por elas atacados.

Duas das exotoxinas mais potentes que se conhecem são produzidas pelas bactérias *Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*, causadoras do tétano e do botulismo, respectivamente. A toxina botulínica é tão potente que apenas uma quantidade mínima de 0,001 a 0,002 mg basta para causar a morte de um ser humano adulto.

Outro exemplo de exotoxina é a secretada pelo *Vibrio cholerae*. Essa bactéria, sendo introduzida no organismo pela água ou pelos alimentos, multiplica-se e fixa-se nas microvilosidades das células intestinais, produzindo uma exotoxina constituída de duas subunidades. A subunidade A se prende à membrana celular, e a subunidade B penetra na célula, onde causa aumento na atividade da adenilato ciclase, enzima que catalisa a síntese de AMP cíclico. Essa molécula, por sua vez, estimula a extrusão de íons e a saída passiva de água. Tem lugar, então, uma extensa secreção de eletrólitos para o lúmen intestinal, com perda de bicarbonato e diminuição na absorção de sódio e cloreto. Ocorre diarreia acentuada, que pode levar à morte por desidratação, acidose e desequilíbrio eletrolítico do meio interno do organismo.

Os processos metabólicos das bactérias são semelhantes, porém não iguais, aos das células eucariontes. As pequenas diferenças tornam possível o uso na medicina de substâncias que bloqueiam eletivamente determinadas vias metabólicas típicas das bactérias, sem prejudicar, ou prejudicando pouco, o organismo do doente (Figura 14.9).

Para resistirem aos ambientes adversos, as bactérias formam esporos

Algumas espécies bacterianas reagem a situações adversas do meio ambiente formando estruturas resistentes chamadas esporos (Figuras 14.10 e 14.11), os quais suportam condições

Tabela 14.1 ▪ Algumas características das exotoxinas e das endotoxinas (lipopolissacarídios) das bactérias patogênicas*.

Exotoxinas	Endotoxinas
Secretadas pelas bactérias; atingem concentrações altas no meio de cultura	Parte integrante da parede das bactérias gram-negativas. São liberadas, principalmente, quando as bactérias morrem
Produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas	Encontradas exclusivamente nas bactérias gram-negativas
São polipeptídios com peso molecular de 10 a 900 kDa	São lipopolissacarídios da parede bacteriana
Altamente tóxicas: quando injetadas em animais de laboratório, bastam alguns microgramas para causar a morte	Toxicidade moderada
Instáveis: a toxicidade é destruída pelo aquecimento superior a 60°C	Mais estáveis; resistem ao aquecimento
Ligam-se a receptores da membrana celular	Não foi observada a ligação com receptores
Geralmente não causam febre	Geralmente causam febre, pela liberação de substâncias ativas no organismo infectado

*Adaptada e reproduzida, com autorização, de Jawetz, E. *et al. Medical Microbiology*, 18th ed. Appleton & Lange, 1989.

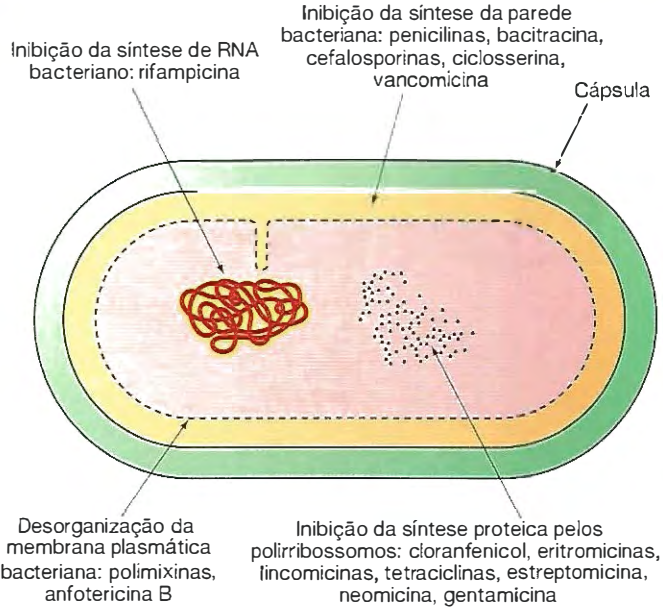



Figura 14.9 ▪ Esquema mostrando alguns exemplos da ação de antibióticos sobre as bactérias. Embora o metabolismo das bactérias seja, em parte, semelhante ao das células eucariontes, algumas vias metabólicas são diferentes. O antibiótico ideal é aquele que inibe vias metabólicas próprias das bactérias, sem afetar muito o metabolismo das células eucariontes, que constituem o corpo do hospedeiro.

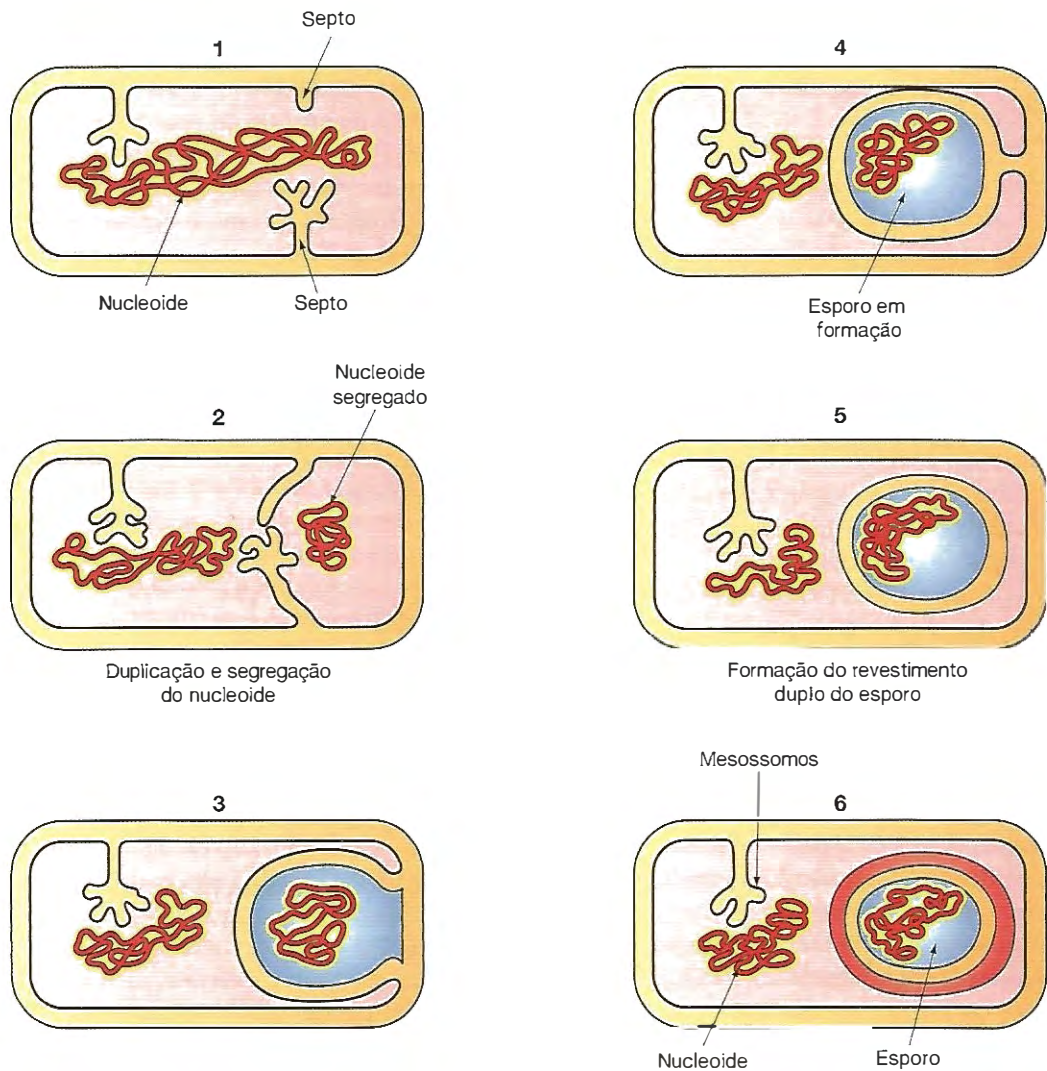



Figura 14.10 ▪ Desenhos esquemáticos mostrando a formação dos esporos bacterianos. **1.** Fase inicial, quando se esboça a septação. **2.** A membrana plasmática se invagina, começando a isolar um nucleoide. **3** e **4.** Fases mais avançadas do esporo em formação, mostrando que um nucleoide já está isolado pela membrana. **5** e **6.** Formação do revestimento do esporo, que, depois, se separa dos restos da bactéria.

Figura 14.11 ▪ Micrografia eletrônica mostrando diversas bactérias formando esporos (*setas*).

críticas de temperatura e falta de água que, normalmente, levariam à morte da célula na forma vegetativa. A forma vegetativa se caracteriza pela capacidade de multiplicação celular e pela realização de todas as atividades típicas da bactéria. Como o esporo se forma dentro da bactéria, é chamado também de endosporo.

A enorme resistência dos esporos a condições adversas foi demonstrada pela descoberta de esporos, em achados arqueológicos, com centenas de anos e ainda capazes de reverter à forma celular vegetativa e se multiplicarem.

Basicamente, os esporos são células cujo citoplasma contém pouquíssima água; por isso, praticamente não têm atividade metabólica, estão circundados por espesso envoltório e não se reproduzem. A formação do esporo é morfologicamente complexa e pode ser subdividida para fins didáticos em várias fases (Figura 14.10):

- Fase 1: A célula bacteriana replica seu cromossomo, formando duas cópias completas, porém contínuas. A bactéria fica com um cromossomo único, muito grande, em razão da não separação do filamento novo de DNA
- Fase 2: O segundo estágio da diferenciação do esporo começa com a invaginação da membrana plasmática, que separa o cromossomo antigo e o novo, cada um em um compartimento, porém de tamanhos desiguais. Cada compartimento é delimitado pela membrana plasmática que cresceu para dentro da bactéria, e o compartimento menor dará origem ao esporo
- Fase 3: Nesta fase, o esporo já está completamente formado e isolado dentro da bactéria
- Fase 4: Em seguida, forma-se uma camada cortical espessa, composta de peptidoglicanas, e surge a parede do esporo, formada também por peptidoglicanas. Contudo, essas moléculas de peptidoglicanas apresentam muitas ligações cruzadas umas com as outras, o que lhes confere grande resistência. Nessa fase, o esporo apresenta, de dentro para fora: o cromossomo e os componentes do citoplasma muito desidratados, a membrana celular, a camada cortical e a parede. Há síntese de dipicolinato de sódio, composto incorporado ao esporo e que parece ter papel importante na resistência do esporo às agressões do ambiente
- Fase 5: Este estágio começa com a formação de um envoltório em torno do esporo. O envoltório é de natureza proteica e particularmente rico em cisteína, um aminoácido contendo enxofre
- Fase 6: Finalmente, o esporo já com o envoltório completo é liberado pela lise da bactéria original (ruptura da membrana e da parede).

A formação dos esporos é desencadeada pelas condições adversas do ambiente, como falta de nutrientes, altas ou baixas temperaturas e dessecação. Essas condições, conforme a bactéria, são estímulos para os genes bacterianos que codificam as proteínas responsáveis pela formação do esporo.

O retorno do esporo à forma celular vegetativa, ou germinação do esporo, geralmente é ativado pela presença de nutrientes e de condições adequadas à proliferação da bactéria. O processo de germinação começa com a degradação das camadas protetoras do esporo, seguida da síntese das macromoléculas essenciais ao crescimento e à proliferação da célula, como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras.

▪ As bactérias se dividem por fissão, e não por mitose

As bactérias se multiplicam por fissão, um processo decorrente da formação de septos que se dirigem da superfície para o interior da célula, dividindo-a em duas células-filhas (Figura 14.12). A fissão é precedida pela síntese e multiplicação dos cromossomos bacterianos; cada célula-filha recebe, pelo menos, uma cópia do cromossomo da célula-mãe.

A síntese do DNA bacteriano se processa de modo semiconservador, como também acontece nas células eucariontes. À medida que o DNA do cromossomo original separa suas duas cadeias, cada uma delas serve como molde, isto é, como fonte de informação sobre a sequência de bases para formação das novas cadeias de DNA. Os dois cromossomos resultantes têm, cada um, uma cadeia antiga e uma cadeia nova de DNA.

A reprodução das bactérias é, em geral, um processo rápido. Em condições ideais de cultura, pode ocorrer uma divisão celular a cada 20 min. Portanto, uma única bactéria é capaz de dar origem a oito bactérias em apenas uma hora. Na natureza, em razão de seu grande número e velocidade de multiplicação, as populações de bactérias aumentam com facilidade, adquirindo rapidamente a capacidade de utilizar novas fontes de nutrientes e adquirindo também resistência a novos anti-

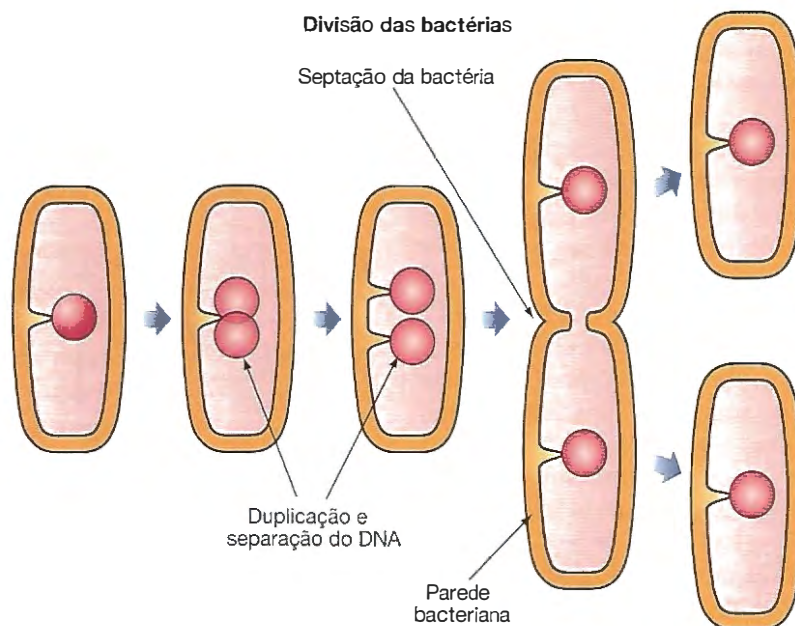



Figura 14.12 ▪ Desenho esquemático ilustrando a divisão de uma célula bacteriana. Primeiro, ocorrem a multiplicação e a separação dos cromossomos e, posteriormente, invaginação da superfície bacteriana, com a formação da parede que irá separar as duas células-filhas. Na célula inicial, para simplificar o desenho, aparece apenas uma molécula de DNA (cromossomo bacteriano), mas, geralmente, existem na célula diversas cópias dessa molécula.

bióticos e a outras moléculas tóxicas para elas. Quanto mais rápida for a proliferação celular, maior será a possibilidade de surgirem bactérias modificadas e mais bem adaptadas ao meio ambiente. Algumas bactérias, porém, têm um ciclo vital lento, como o do *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase ou mal de Hansen, cuja duplicação dura cerca de 12 dias na lesão do paciente.

▪ A transferência de informação genética (DNA) de uma bactéria para outra ocorre com frequência

Como todas as células, as bactérias estão sujeitas a mutações que alteram o seu genoma. Além das mutações, outras transformações do genoma podem ocorrer pela transferência de DNA de uma bactéria para outra. Esse processo faculta uma grande variação genética nas bactérias, combinando caracteres de várias raças ou linhagens, e as bactérias cujo genoma lhes proporcionar um fenótipo mais adaptado ao meio sobreviverão melhor graças às forças de seleção natural.

Em virtude da relativa facilidade de transferir DNA de uma bactéria para outra, elas são muito usadas pelos biologistas moleculares como um meio de transportar genes, mesmo provenientes de organismos muito diferentes das bactérias, como plantas e mamíferos.

A transferência de informação genética entre bactérias é possível graças a três mecanismos: transformação, conjugação e transdução (Figura 14.13).

▪ *Transformação*

Esse processo ocorre, por exemplo, quando se adicionam a uma cultura bacteriana segmentos de DNA extraídos de outras bactérias ou então quando, em condições naturais, uma bactéria se rompe e libera seu DNA (Figura 14.13A). Quando o processo é realizado experimentalmente em laboratório e em condições adequadas, observa-se que algumas bactérias da cultura adquirem características hereditárias derivadas da informação contida nos segmentos de DNA recebidos. Um exemplo clássico é a transformação de *Pneumococcus* avirulentos (incapazes de produzir doença) em *Pneumococcus* virulentos (capazes de causar doença), após sua incubação em meio ao qual foi adicionado DNA extraído de *Pneumococcus* da linhagem virulenta. O processo de transformação não ocorre indiscriminadamente entre quaisquer bactérias. As bactérias doadoras e receptoras devem ser compatíveis.

Esse tipo de transferência de genes, descoberto em condições experimentais, também pode ocorrer em condições de vida natural, levando ao surgimento de novas linhagens de bactérias na natureza. Bactérias que morrem em seu ambiente natural se desintegram e seu DNA pode ser partido em pedaços, sendo captado pelas bactérias adjacentes. Contudo, são poucas as bactérias com a propriedade de captar DNA com facilidade. Alguns anos antes da transformação de *Pneumococcus* pela adição de DNA às culturas, já havia sido notado que a injeção, em animal de experimentação, de *Pneumococcus* virulentos mortos, junto com *Pneumococcus* avirulentos vivos, causava pneumonia grave e morte dos animais, indicando a transferência de algo, que foi chamado na época de fator de virulência, das bactérias mortas para as bactérias avirulentas vivas. Atualmente, sabe-se que houve transferência de DNA das células virulentas mortas para as células avirulentas vivas, que assim modificaram o genoma e passaram a causar doença.

No laboratório, as bactérias geralmente recebem tratamentos especiais que as tornam permeáveis a fragmentos de DNA. São dois os processos usados para essa finalidade pelos biologistas moleculares. Em um dos processos, as bactérias receptoras são resfriadas na presença de substâncias que afrouxam a estrutura da parede bacteriana, facilitando a entrada do DNA.

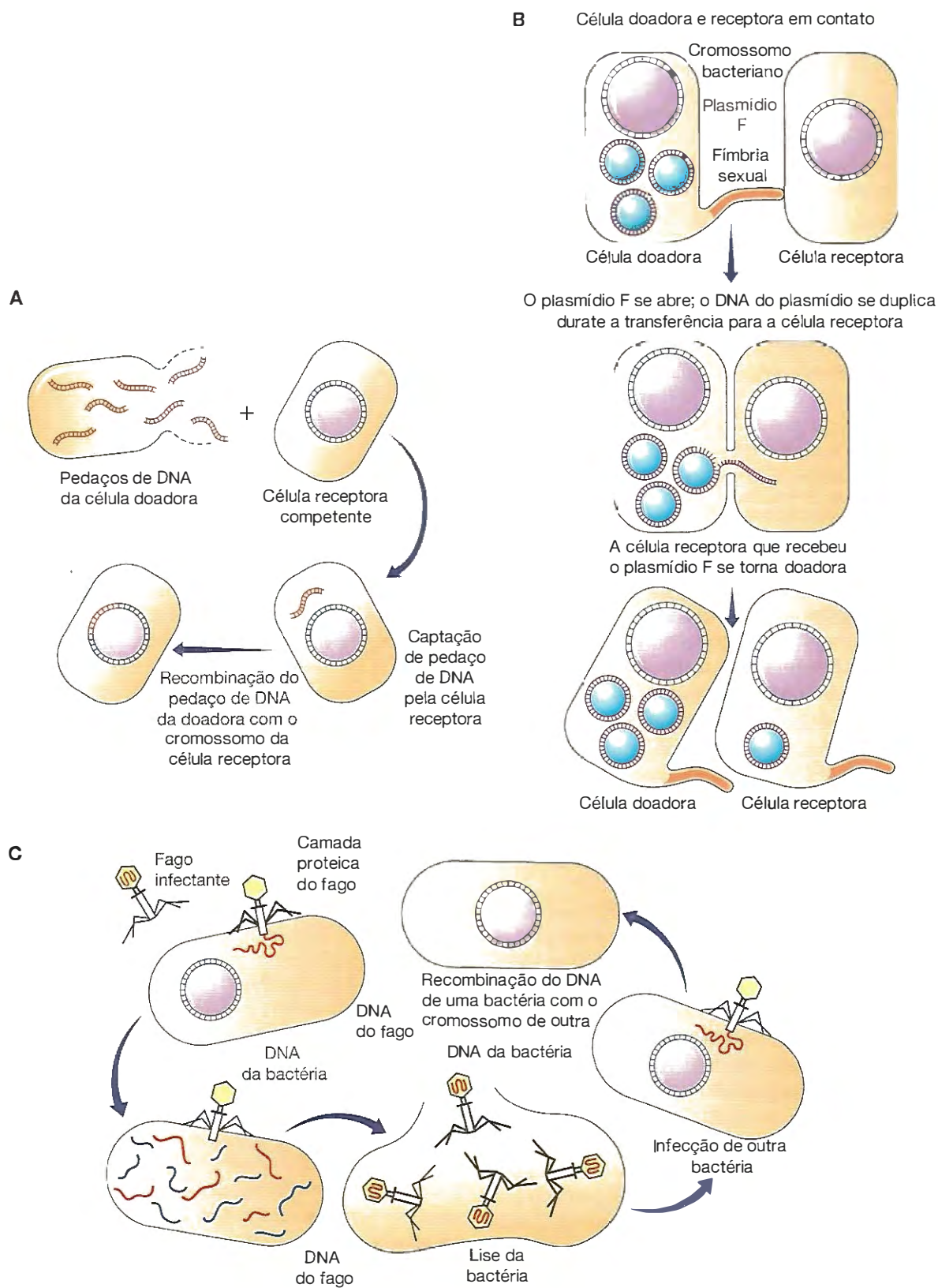



Figura 14.13 ▪ Desenhos das várias modalidades de transferência de DNA (informação genética) entre bactérias. Em **A**, o processo de transformação, no qual fragmentos de DNA, liberados no meio extracelular, por bactérias que morrem e se rompem ou então colocados experimentalmente no meio de cultivo, entram na bactéria e são incorporados ao seu genoma. Em **B**, um plasmídio passa por meio de uma ponte, instalando-se em outra bactéria. É o processo de conjugação. Neste processo, a fímbria sexual da célula doadora se fixa à superfície da célula receptora e estimula a formação de uma ponte entre as duas bactérias. A ponte se forma em local próximo à fímbria, mas a fímbria não se transforma em ponte de passagem de DNA; porém, serve como elemento de fixação entre as duas bactérias. A bactéria receptora forma uma fímbria própria e se transforma em doadora. A presença da fímbria sexual caracteriza a bactéria doadora. Em **C**, um bacteriófago, depois de incorporar DNA bacteriano ao seu próprio DNA, transfere informação genética do nucleoide de uma bactéria para o nucleoide de uma segunda bactéria. Esse processo de transferência de DNA chama-se transdução por fago.

O outro processo consiste em submeter o meio de cultura onde está a bactéria receptora a uma corrente elétrica de alta voltagem, por um tempo muito curto, o que tem o mesmo efeito de afrouxar a parede bacteriana, tornando-a mais permeável aos fragmentos de DNA presentes no meio de cultura.

O DNA que penetra na bactéria pode ser reconhecido como estranho e destruído pelas enzimas de restrição, cuja função é defender a bactéria contra vírus invasores (bacteriófagos), destruindo seu DNA. Porém, na transformação como a descrita no exemplo do *Pneumococcus*, o processo de transferência de genes é bem-sucedido e ocorre uma recombinação, que consiste na integração, no cromossomo bacteriano, do DNA que penetrou na bactéria.

Conjugação

Nesse processo, a passagem de DNA tem lugar por meio de pontes ou comunicações citoplasmáticas temporárias, entre duas células bacterianas.

A conjugação foi descoberta quando duas cepas de *Escherichia coli*, de constituições genéticas diferentes, foram cultivadas juntas, dando origem a bactérias híbridas. O estudo desse fenômeno mostrou que ele é insensível à adição de DNAse ao meio de cultura, o que eliminou a possibilidade de se tratar de uma transformação.

Na conjugação, a passagem de DNA ocorre por meio das pontes citoplasmáticas, chamadas pontes de conjugação, e uma das cepas transfere informação genética para a outra (Figura 14.13B). A cepa doadora contém no citoplasma um filamento circular de DNA, o fator F ou de fertilização, que é um plasmídio (plasmídio F). Esse plasmídio contém genes que codificam a fímbria sexual, característica das células doadoras, e que mantém juntas as duas bactérias, possibilitando a formação da ponte de conjugação.

Os plasmídios são moléculas circulares de DNA em hélice dupla, muito menores do que os cromossomos bacterianos, contendo genes que não são essenciais para a vida das bactérias, mas conferem determinadas propriedades que podem ser importantes para a sobrevivência delas em ambientes desfavoráveis. Por exemplo, eles podem conter genes para proteínas que possibilitem às bactérias degradar moléculas tóxicas, como as contidas no petróleo, ou neutralizar os efeitos do mercúrio e outros metais pesados. Eles têm também os genes responsáveis pela multiplicação do próprio plasmídio, que geralmente está presente em mais de uma cópia, e genes para a transferência do plasmídio de uma bactéria para outra. Embora mais frequentes nas bactérias e mais estudados nessas células procariontes, os plasmídios podem ser encontrados também em leveduras, protozoários e em células dos vegetais.

Existem plasmídios, denominados fatores de transferência de resistência ou fatores R, que contêm genes que codificam enzimas que destroem antibióticos, tornando as bactérias resistentes à ação desses agentes terapêuticos. Os plasmídios R podem acumular informação genética e conferir à bactéria receptora resistência a diversos antibióticos, o que representa um problema médico muito grave, tornando necessário que se estude constantemente o desenvolvimento de novos antibióticos, à medida que as bactérias ficam resistentes aos antibióticos já existentes. Como cada célula bacteriana geralmente contém várias cópias do mesmo plasmídio, os antibióticos muitas vezes são destruídos com grande eficiência. Para a bactéria é mais interessante ter os genes contra os antibióticos nos plasmídios do que nos cromossomos dos nucleoides, pois os primeiros são mais numerosos.

Na conjugação, apenas um dos filamentos do plasmídio é transferido da célula doadora para a célula receptora. O filamento que fica na bactéria doadora se mantém circular, porém o filamento que será transferido para a receptora se rompe e migra pela ponte de conjugação, sob a forma de um filamento não circular. Durante a transferência, o filamento que permanece na célula se duplica, acontecendo o mesmo com o filamento que entra na bactéria receptora, logo depois da transferência. Em ambos os casos, os filamentos antigos atuam como modelos (*templates*), o que possibilita a reconstrução de duas novas hélices duplas, com as bases dos filamentos antigos determinando a sequência das bases nos filamentos novos.

Geralmente, apenas o DNA dos plasmídios é transferido durante a conjugação. Só muito raramente há transferência do DNA do cromossomo de uma bactéria para outra. Isso acontece quando o plasmídio da célula doadora se integrou ao cromossomo bacteriano. Quando esse plasmídio, sob a forma de um de seus filamentos, é transferido para a bactéria receptora, carrega consigo um filamento do cromossomo da bactéria. Na célula receptora, tanto o DNA do plasmídio como o do cromossomo da célula doadora serão transformados em filamento de hélice dupla pela síntese de um filamento complementar.

As fímbrias não participam da conjugação das bactérias gram-positivas. Nesse grupo de bactérias, as células candidatas a receber plasmídios secretam moléculas que estimulam as doadoras a produzir proteínas que favorecem a união das bactérias, possibilitando a formação das pontes de transferência entre doadoras e receptoras. Em geral, as bactérias gram-positivas e gram-negativas, que podem ocorrer juntas no mesmo ambiente natural, só trocam plasmídios com bactérias do mesmo grupo, e algumas só o fazem com bactérias

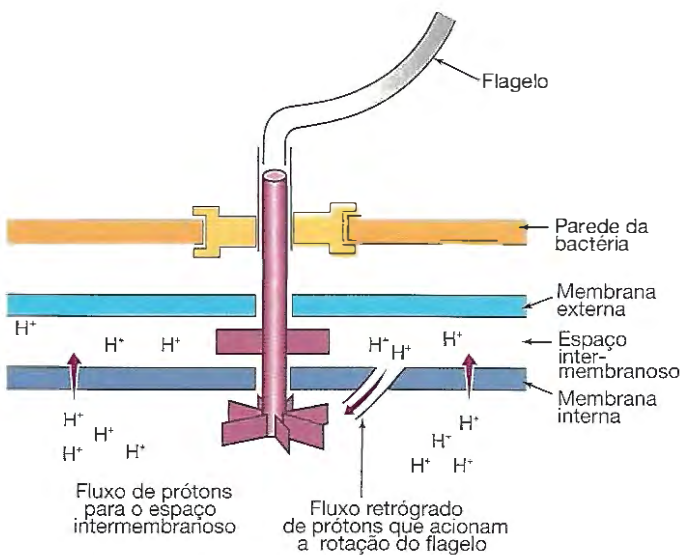



Figura 14.14 ▪ Esquema do mecanismo de rotação dos flagelos para movimentar as bactérias. O processo ocorre em razão de um fluxo de prótons produzidos pela cadeia transportadora de elétrons. Os prótons atravessam a membrana plasmática da bactéria, acumulando-se no espaço intermembranoso. O fluxo reverso de prótons, em vez de produzir ATP como nas mitocôndrias, aciona o flagelo, que pode chegar a 100 rotações por segundo.

da mesma espécie. Todavia, existem plasmídios "promíscuos", pouco frequentes, que conseguem transferir DNA entre gram-positivas e gram-negativas.

Os plasmídios não existem exclusivamente nas bactérias, embora tenham sido mais estudados nestas células. Todavia, já foram isolados plasmídios de leveduras, de protozoários e de vegetais, por exemplo.

Transdução

É o processo pelo qual uma bactéria transmite informação genética a outra, usando como portador um vírus bacteriano (bacteriófago).

Durante o processo de formação dos bacteriófagos, pode ocorrer a produção de alguns bacteriófagos contendo DNA da bactéria, em vez de terem somente DNA do bacteriófago (Figura 14.13C).

Esses bacteriófagos defeituosos, que contêm DNA bacteriano, irão injetar genes de uma bactéria para o interior de outra, assim transferindo informação genética. Posteriormente, o segmento de DNA da primeira bactéria é incorporado ao cromossomo da segunda bactéria, sendo transmitido às células descendentes da célula receptora (Figura 14.13C).

Os geneticistas que estudam bactérias utilizam com frequência a transdução por ser um processo relativamente simples de transferir genes entre bactérias diferentes. Os bacteriófagos são cultivados com as bactérias doadoras, que são destruídas pelos bacteriófagos, e muitos de seus genes serão incluídos nos novos bacteriófagos. Infectando-se culturas das bactérias receptoras com esses bacteriófagos, muitas serão mortas pelos bacteriófagos, porém algumas receberão bacteriófagos contendo genes da bactéria doadora, que poderão ser incorporados no DNA da receptora.

O bacteriófago, com seu genoma incorporado ao cromossomo bacteriano, é chamado profago e a bactéria que o contém é denominada bactéria lisogênica (geradora de lise ou ruptura) porque, quando cultivada com bactérias sem o fago, pode produzir e liberar bacteriófagos completos e infectantes, causando a lise das bactérias da cultura.

As bactérias se movimentam pela rotação de flagelos movidos por fluxo de prótons

Tanto estrutural como funcionalmente, os flagelos das células procariontes são completamente diferentes dos encontrados nas células eucariontes. Nas bactérias, os flagelos são organelas de locomoção medindo 3 a 12 μm de comprimento, ocos e com diâmetro de 12 a 30 nm. Cada flagelo (Figura 14.14) é uma estrutura rígida, que apresenta na base um gancho que se introduz em orifícios de discos proteicos fixos localizados no envoltório (membrana plasmática e parede) da bactéria. Os discos proteicos atuam como "rolamentos" que facilitam o movimento rotatório do flagelo, ao mesmo tempo em que servem de vedação para o conteúdo da bactéria. A parte final do gancho apresenta um "rotor" que é impulsionado por um gradiente de prótons formado por meio da membrana bacteriana. Quando o "rotor" gira, transmite seu movimento de rotação para o gancho e para o flagelo, pois os três são partes de um conjunto único. Nesse caso, a energia para o movimento não é fornecida por ATP, mas diretamente pelo fluxo de prótons (Figura 14.14).

Os flagelos bacterianos são dotados de movimento rápido de cerca de 100 rotações por segundo, que impulsiona a bactéria na direção dos nutrientes (quimiotaxia positiva) ou em direção oposta às substâncias tóxicas (quimiotaxia negativa). As substâncias quimiotáticas agem sobre receptores situados na membrana da bactéria. O mecanismo pelo qual uma modificação no ambiente causa uma resposta no comportamento da bactéria é uma transdução sensorial. Esse mecanismo é responsável pela quimiotaxia (movimento na direção de determinadas moléculas, ou em sentido contrário, afastando-se delas) e também por outras respostas como a aerotaxia, que é o movimento na direção de concentrações ótimas de oxigênio, e a fototaxia (movimento das bactérias fotossintéticas na direção da luz).

O flagelo das bactérias é um polímero de monômeros de flagelina, uma proteína com massa molecular de 40 kDa (quilodáltons). As flagelinas de bactérias diferentes não são exatamente iguais, apresentando diferenças na estrutura primária (composição e sequência de aminoácidos). Os flagelos removidos experimentalmente, por agitação mecânica das bactérias, se refazem dentro de 3 a 6 min, tempo necessário para a síntese e agregação dos novos monômeros de flagelina. Como seria de esperar, os flagelos não se refazem quando a síntese proteica é inibida, como, por exemplo, pela adição do antibiótico cloranfenicol.

Micoplasmas são as células procariontes mais simples

Os micoplasmas são bactérias muito pequenas, geralmente com 0,2 a 2 μm de tamanho, podendo apresentar-se com dimensão ainda menor. São as menores células conhecidas, e os menores micoplasmas (125 a 150 nm) são do tamanho dos maiores vírus. Seu limite externo é a própria membrana plasmática, pois os micoplasmas, ao contrário das outras bactérias, não possuem parede e, por isso, são pleomórficos (têm forma variável).

A estrutura dos micoplasmas é semelhante à das outras bactérias, exceto pela ausência de parede. Seu citoplasma apresenta grande quantidade de ribossomos, alguns vacúolos e grânulos. O teor de DNA de um micoplasma é aproximadamente 10 vezes menor do que o da maioria das bactérias. Ao contrário das demais bactérias, alguns micoplasmas apresentam esteróis em suas membranas, mas não são capazes de sintetizar essas moléculas, retirando-as dos organismos que atacam, ou do soro sanguíneo animal que deve ser adicionado aos meios de cultura. Os esteróis conferem maior estabilidade à membrana dos micoplasmas, protegendo essas bactérias sem paredes contra as modificações na osmolaridade do meio.

As cianobactérias ou cianofíceas ("algas azuis") são as bactérias fotossintéticas mais aperfeiçoadas

Além de clorofila, as cianobactérias contêm outros pigmentos, denominados, genericamente, de ficobilinas. Destas,

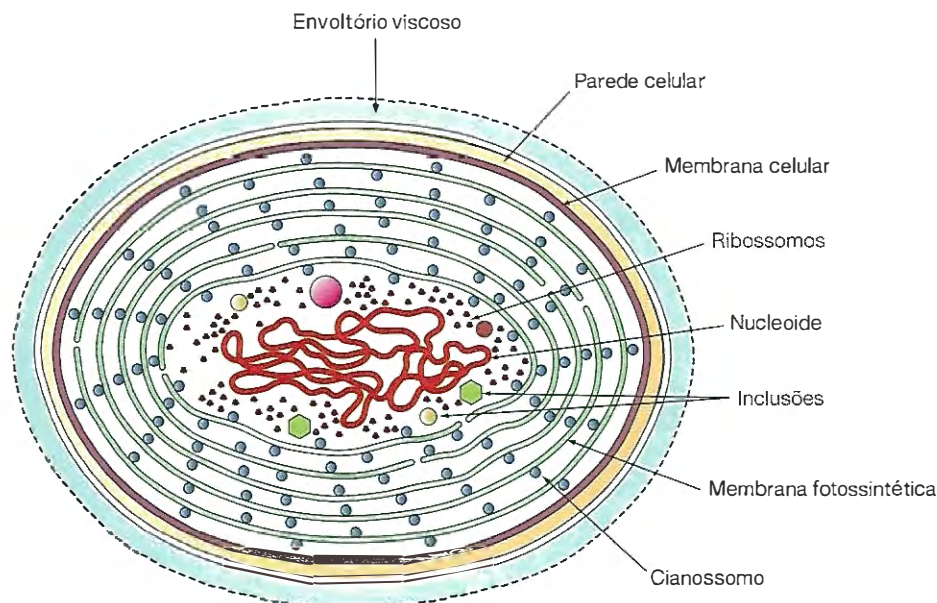



Figura 14.15 ▪ Desenho esquemático da estrutura de uma cianobactéria. Observar o nucleoide central, envolto por camadas concêntricas de membranas do sistema fotossintético. As vesículas ou grânulos, denominados cianossomos, também fazem parte do sistema fotossintético dessa bactéria.

a ficocianina (pigmento azul) e a ficoeritrina (pigmento vermelho) são as mais comuns e responsáveis pela variedade de cores encontradas nas cianobactérias. A estrutura das cianobactérias é, basicamente, a de uma bactéria, pois exibem parede celular, cápsula, nucleoide, ribossomos e inclusões de fosfato, proteínas e lipídios (Figura 14.15).

Chama atenção o seu sistema fotossintético, formado por sacos membranosos, achatados e concêntricos, entre os quais se encontram grânulos de 40 nm de diâmetro, presos à parede externa dos sacos. Esses grânulos, denominados cianossomos, contêm ficocianina e ficoeritrina, ao passo que a estrutura membranosa contém clorofila e outros compostos do sistema de fotossíntese. A energia solar absorvida pela ficocianina e pela ficoeritrina é transferida para as membranas que contêm clorofila, nas quais se processa a fotossíntese. A ficocianina e a ficoeritrina aumentam o espectro de utilização da luz solar, em comparação com a absorção proporcionada pela clorofila sozinha.

Como nas demais bactérias, a divisão celular ocorre por crescimento e invaginação da parede celular. As cianobactérias não apresentam cílios nem flagelos; não obstante, elas se movimentam por deslizamento sobre uma superfície sólida. Uma camada de material viscoso existente por fora da parede das cianobactérias facilita o deslizamento dessas bactérias.

Algumas cianobactérias, além de fotossintéticas, são capazes de reduzir nitrogênio para formar amônia (NH_3). Usando água, oxigênio, gás carbônico e amônia, elas sintetizam grande variedade de moléculas orgânicas, sendo capazes de sobreviver com esses parcos recursos nas condições mais adversas, desde que na presença da luz. Para beneficiar sua nutrição e captação de energia, muitas cianobactérias apresentam vacúolos alongados, envoltos por membrana proteica, contendo gás, que têm a capacidade de controlar a flutuação da célula, colocando-a na profundidade ótima em nutrientes, concentração de oxigênio e intensidade luminosa. Esses vacúolos bacterianos já foram descritos neste capítulo.

Resumo

As células procariontes, provavelmente por não disporem do sistema de membranas internas, tão desenvolvido nas células eucariontes, são de menor tamanho. Todas as bactérias são células procariontes.

Os vários tipos de bactéria apresentam grande diversidade metabólica, o que lhes permite viver nas condições ambientais mais variadas. Quanto à forma, podem ser esféricas, nos cocos; alongadas, nos bacilos; e helicoidais, nos espirilos. Aos pares, os cocos formam diplococos; em grupos irregulares, os estafilococos; e, quando dispostos em fileira, são chamados de estreptococos.

O microscópio eletrônico mostra que a estrutura das bactérias é relativamente simples. O DNA é um filamento circular, de cadeia dupla, localizado em uma região da célula denominada nucleoide. Cada célula bacteriana geralmente tem diversas cópias desse cromossomo, que é muito mais simples do que o das células eucariontes. No citosol existem polirribossomos, além de grânulos de depósito. Por fora da membrana plasmática, encontra-se a parede, que é rígida, confere forma à célula e está presente em todas as bactérias, exceto nos micoplasmas. Mais externamente à parede, existe, em todas as bactérias, um material viscoso que, muito frequentemente, se condensa para formar a cápsula bacteriana.

As paredes são de dois tipos básicos, facilmente identificáveis por coloração, o que permite a divisão das bactérias em dois grandes grupos: as bactérias gram-positivas e as gram-

negativas. Somente as primeiras se coram em roxo pela técnica de coloração de Gram.

A superfície bacteriana pode apresentar prolongamentos de dois tipos: os flagelos e as fímbrias. Os flagelos servem para a locomoção, são maiores do que as fímbrias e constituídos de monômeros da proteína flagelina. Os movimentos flagelares das bactérias utilizam a energia fornecida por um fluxo de prótons.

As fímbrias comuns são curtas, finas e rígidas. As fímbrias sexuais são maiores e servem para manter juntas a célula doadora e a receptora, durante a transferência unidirecional de DNA de plasmídios, no processo de conjugação. O DNA passa de uma bactéria para outra por pontes entre a bactéria doadora e a receptora, não passando por dentro da fímbria sexual, cujo papel é apenas fixar temporariamente as duas bactérias.

De acordo com seu metabolismo, as bactérias podem ser fototróficas, quando utilizam a energia da luz solar para sintetizar moléculas orgânicas, a partir de moléculas simples, e quimiotróficas, quando se nutrem de compostos químicos complexos já formados. Estas últimas podem utilizar compostos inorgânicos, quando são chamadas químiolitotróficas, ou, então, exigir compostos orgânicos, sendo denominadas de quimiorganotróficas.

Algumas bactérias, diante de condições adversas do ambiente, originam esporos, que são extremamente resistentes às variações de temperatura e ao dessecamento.

As bactérias se dividem por fissão da célula em duas, após duplicação do filamento circular de DNA. Muitas bactérias são portadoras de filamentos circulares de DNA menores, extracromossômicos: os plasmídios.

Chama-se transformação a passagem de fragmentos de DNA de uma bactéria para outra, por meio do meio de cultivo no laboratório ou, raramente, do meio natural onde elas vivem. Na natureza, a transformação depende da ruptura de bactérias e liberação de seu DNA. A conjugação é a passagem direta de informação genética (DNA) de uma bactéria para outra por dentro de túneis formados entre duas bactérias. Finalmente, na transdução, a informação genética é transferida de uma célula para outra por meio de vírus (bacteriófagos). Os bacteriófagos que se formam em uma célula podem, acidentalmente, conter DNA da bactéria. Quando infecta outra bactéria, o bacteriófago transfere para o seu novo hospedeiro o fragmento de DNA trazido da primeira bactéria e que pode ser destruído ou incorporado ao DNA da segunda bactéria.

As cianobactérias são bactérias fotossintéticas (aproveitam a energia da luz solar para sintetizar moléculas orgânicas) que contêm ficoeritrina e ficocianina, além de clorofila. Graças à presença desses três pigmentos, as cianobactérias são muito eficientes na absorção da energia dos diversos comprimentos de onda da radiação solar. A energia dos comprimentos de onda absorvida pela ficocianina (pigmento azul) e pela ficoeritrina (pigmento vermelho) é transferida para a clorofila, na qual se completa a fotossíntese. Os pigmentos azul e vermelho estão contidos em grânulos separados, e a clorofila está ligada a membranas paralelas à membrana plasmática.

Bibliografia

Allison, L.A.: *Fundamental molecular biology*. Blackwell Publishing, 2008.
Balows, A. (ed.): *The Prokaryotes* – 4 vols. Springer-Verlag, 1992.
Brock, T.D., Madigan, M.T. *Biology of Micro-organisms*, 6th ed. Prentice-Hall, 1990.
Davis, B.D. *et al. Microbiology*, 4th ed. Lippincott, 1990.
Lev, S.B. The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Amer.*, **278**(3):32, 1998.
Lim, D. *Microbiology*. McGraw-Hill, 1998.
Losick, R., Kaiser, D. Why and how bacteria communicate. *Sci. Amer.*, **276**(2):52,1997.
Madigan, M.T., Marrs, B.L. Extremophiles. *Sci. Amer.*, **276**(4):66, 1997.
Miller, R.V. Bacterial gene swapping in nature. *Sci. Amer.*, **278**(1):47, 1998.
Silverman, M., Simon, M.I. Bacterial flagella. *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**:397, 1977.
Walsby, A.E. Gas vesicles. *Microb. Rev.*, **58**:94, 1994.

15 Mecanismos de Regulação das Atividades Celulares: Como se Originam Algumas Doenças

Roteiro

- Para o perfeito funcionamento das células, o organismo animal deve manter a composição do meio interno constante
- No meio intracelular, do ponto de vista funcional e estrutural, as moléculas mais importantes são os ácidos nucleicos e as proteínas
- Defeitos na replicação do DNA, na sua transcrição para RNA e na tradução deste em proteínas podem causar doenças
- Podem ainda ocorrer defeitos nas moléculas após a tradução (defeitos pós-traducionais)
- Os defeitos gênicos nas células germinativas transmitem-se para as gerações futuras
- Os defeitos gênicos nas células somáticas transmitem-se apenas para outras células do mesmo indivíduo
- A cada dia aumenta o número de doenças que podem ser explicadas em termos de biologia celular e molecular, o que facilita o diagnóstico e o tratamento
- Alterações nas proteínas estruturais também podem causar doenças.

Este capítulo foi elaborado com o objetivo de apresentar uma visão panorâmica e simplificada dos principais mecanismos que regulam as atividades celulares, bem como explicar, de modo geral, o crescimento acelerado do conhecimento desses mecanismos e do seu impacto sobre a formação de profissionais nas áreas biomédica e da saúde. Trata-se de uma introdução à noção de como a perturbação desses fatores, por agentes intrínsecos ou extrínsecos às células, podem gerar doenças.

Para os seres vivos, é importante a presença de mecanismos de ajuste às variações dos meios externo e interno, mantendo constantes os meios intra e extracelular do organismo, dentro de limites pouco variáveis, e compatíveis com a alta eficiência da maquinaria celular. A importância da manutenção do meio interno foi primeiro postulada pelo fisiologista Claude Bernard, na segunda metade do século passado, sendo posteriormente desenvolvida por outro fisiologista, Walter B. Cannon, que criou o termo homeostase para designar a tendência dos organismos vivos em manter constante o meio interno. Quando o organismo não consegue manter a homeostase, ocorre a doença.

Os ácidos nucleicos e as proteínas são moléculas muito importantes nos processos vitais, sendo fácil compreender o seu papel relevante na manutenção da homeostase e, portanto, da saúde. Os ácidos nucleicos armazenam informação genética no núcleo celular, sob a forma de DNA, e transmitem essa informação ao citoplasma, pelos mRNA. As proteínas desempenham papel relevante na atividade celular, pois são responsáveis pelas inúmeras reações enzimáticas e muitas têm papel estrutural. Há proteínas estruturais intracelulares, constituindo o citoesqueleto contrátil, e muitas outras (colágeno, elastina, fibronectina, laminina, osteonectina) exercem papel estrutural e funcional no meio extracelular, no qual criam condições adequadas para o funcionamento das células. Para que as enzimas possam funcionar eficientemente e reagir de modo adequado às variações dos meios interno e externo, desenvolveram-se, durante a evolução, complexos mecanismos de regulação gênica e enzimática, que tornam possível controlar a atividade das enzimas, adequando-as às necessidades do organismo. O conhecimento dos mecanismos regulatórios das atividades celulares é de grande importância não só para se compreender as doenças, como também para fornecer bases racionais para a sua terapêutica.

A Figura 15.1 mostra uma visão panorâmica dos vários níveis nos quais, por meio dos ácidos nucleicos e proteínas, podem ocorrer regulações das atividades celulares. A análise dessa figura mostra que podem ocorrer alterações qualitativas e quantitativas nos genes. Também podem ocorrer alterações nos processos de replicação do DNA, na transcrição do DNA para RNA, na tradução do mRNA em proteína, além das alterações que podem acontecer após a tradução (alterações pós-traducionais).

A Tabela 15.1 mostra alguns exemplos do envolvimento de estruturas celulares, como microtúbulos, mitocôndrias, peroxissomos e DNA cromossômico, no aparecimento de diversas doenças.

Alterações qualitativas e quantitativas do DNA regulam atividades fisiológicas, mas podem causar doenças

A constância qualitativa e quantitativa do DNA é característica importante, e, para que isso aconteça, é necessário

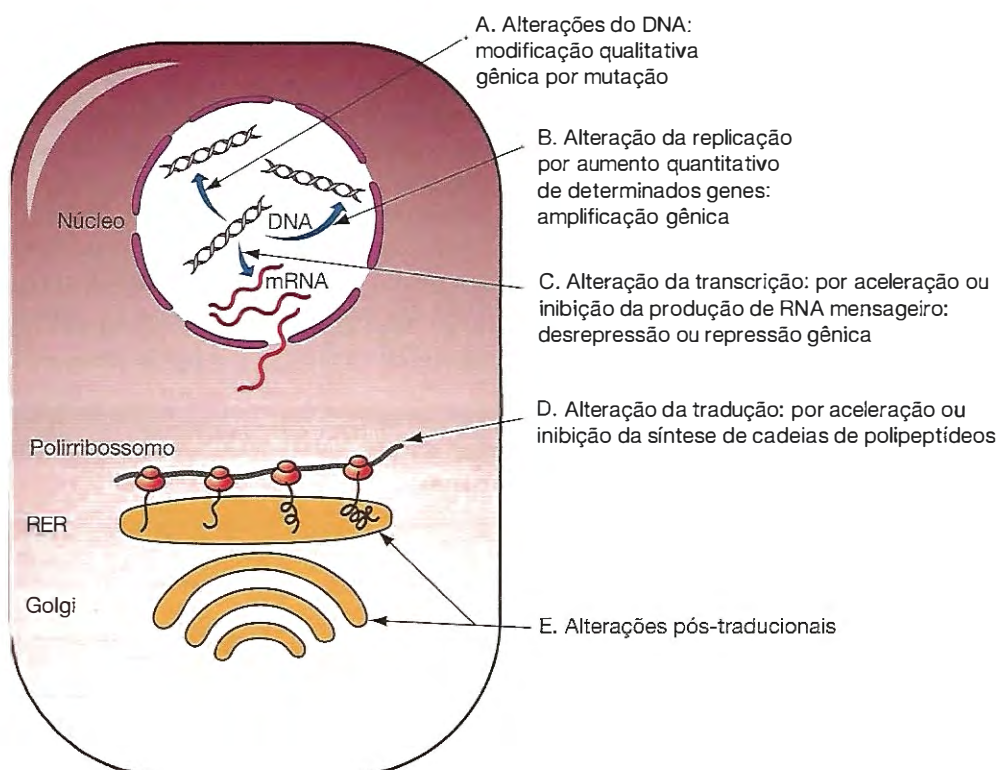



Figura 15.1 ▪ Visão geral da gênese dos principais mecanismos de regulação da atividade celular, e cujas alterações levam frequentemente a doenças.

Tabela 15.1 • Doenças decorrentes de alterações em vários componentes celulares.*

Componente celular envolvido	Doença	Causa	Alteração tecidual visível	Aspectos clínicos
Microtúbulo	Doença de Kartagener	Ausência de braços nos microtúbulos	Ausência de braços nos microtúbulos dos cílios e flagelos	Imobilidade dos cílios e flagelos; infecções respiratórias e esterilidade masculina (espermatozoides sem movimentação)
	Diabetes no roedor *Acomys*	Ausência de microtúbulos citoplasmáticos nas células produtoras de insulina	Com exceção dos microtúbulos, o aspecto da célula é normal	Aumento da taxa de glicose no sangue (diabete) em razão da não secreção da insulina sintetizada
Mitocôndria	Citopatia mitocondrial	Desacoplamento da oxidação fosforilativa	Forma e quantidade alteradas das mitocôndrias	Metabolismo basal elevado, emagrecimento
Peroxissomo	Síndrome cérebro hepatorrenal (Zellweger)	Mutação da enzima peroxissômica	Ausência de enzimas nos peroxissomos	Retardamento psicomotor, disfunção do fígado e lesão renal
Lisossomo	Leucodistrofia metacromática (lipoidose)	Ausência de sulfatase lisossômica	Acúmulo de lipídios nas células	Retardamento mental e psicomotor
	Doença de Hurler	Ausência de L-iduronidase lisossômica	Acúmulo de sulfato de dermatana em células	Retardamento mental e do crescimento
DNA cromossômico	*Osteogenesis imperfecta*	Mutação de gene do colágeno	Alteração das fibras colágenas	Fraturas frequentes em razão da síntese defeituosa de fibras de colágeno
Retículo endoplasmático rugoso	Escorbuto	Carência de vitamina C, cofator necessário para a síntese de colágeno	Alteração das fibras colágenas	Hemorragias frequentes e queda de dentes em razão da síntese de colágeno
Complexo de Golgi	Doenças das células I	Ausência de enzimas fosforila as enzimas lisossômicas	Acúmulo de inclusões nos fibroblastos	Crescimento e desenvolvimento mental retardados
Complexo de Golgi e grânulos de secreção	Diabete proinsulínica	Não transformação da proinsulina em insulina nos grânulos de secreção	—	Diabetes em razão da falta de insulina no sangue

*Todas as doenças apresentadas, com exceção do diabetes do roedor *Acomys*, são humanas.

que os processos de replicação ocorram com fidelidade. Isso, porém, nem sempre acontece, e alterações do DNA podem causar doenças. Mas é preciso lembrar que o DNA não é tão estável quanto se acreditava até há alguns anos e que essa discreta instabilidade tem grande significado evolutivo, pois a evolução é um processo muito lento e pode se aproveitar das raras modificações que podem ter lugar no DNA.

O DNA pode sofrer alterações qualitativas em razão de mutações, que podem ser espontâneas ou provocadas. As mutações, quando ocorrem na linhagem das células germinativas (ovócitos e espermatozoides), podem gerar as doenças hereditárias, como, por exemplo, a hemofilia do tipo B, distrofia muscular de Duchenne e neurofibromatose. Quando a alteração do DNA ocorre em células somáticas, causa doenças não hereditárias. Os tumores malignos (câncer) são causados por mutações de células somáticas.

As mutações podem agir diretamente sobre a sequência de bases no DNA, que, então, codificará uma proteína defeituosa. Podem, também, afetar as sequências de bases no DNA que codificam as enzimas responsáveis por modificações pós-traducionais de certas proteínas. Como essas enzimas são muito numerosas, a probabilidade de ocorrência de doenças por mutações que afetam o acabamento pós-traducional das proteínas é muito grande.

Além de alterações gênicas por mutações localizadas na sequência do DNA, também podem ocorrer deleções ou acréscimos em cromossomos inteiros, ou em partes de cromossomos (defeitos cromossômicos). Essas alterações cromossômicas são visíveis ao microscópio óptico. As Tabelas 15.1 e 15.2 ilustram alguns casos de doenças causadas por defeitos nos cromossomos.

Além dos casos já mencionados, ocorrem modificações de DNA que podem transferir-se de um cromossomo para outro

Tabela 15.2 • Exemplos de algumas alterações cromossômicas que levam a doenças no homem.

Tipo de cromossomo	Tipo de lesão	Doença causada	Sintomas principais
Autossomo	Presença de um cromossomo 21 a mais (trissomia)	Síndrome de Down	Retardamento mental. Faces características
	Perda de parte de um dos cromossomos 22 (deleção parcial)	Meningioma benigno (tumor)	Tumor dos envoltórios do sistema nervoso central (meninges)
	Perda total de um dos cromossomos 22 (deleção total)	Meningioma maligno	Observe que o grau de alteração do cromossomo influi na agressividade do tumor
Cromossomo sexual	Presença de um cromossomo X a mais	Síndrome de Klinefelter	Atrofia testicular. Retardamento mental. Aspecto físico feminino
	Presença de três ou quatro cromossomos X	Multiplicidade dos cromossomos X	Retardamento mental. Menstruações irregulares. Fertilidade preservada
	Ausência ou lesão de um dos dois cromossomos X	Síndrome de Turner	Aspecto feminino. Estatura baixa

(translocações), processos esses responsáveis por algumas doenças. Um exemplo, bem ilustrativo, é o linfoma de Burkitt, tumor maligno do tecido linfático. Nessa doença, ocorre translocação do oncogene c-myc do cromossomo 8 para o 14. O oncogene c-myc se insere no cromossomo 14, próximo a uma sequência de DNA fortemente ativador (promotor), levando o oncogene a se expressar intensamente, o que estimula a multiplicação anômala das células linfoides. As alterações quantitativas do DNA são exemplificadas nos processos de amplificação gênica que ocorrem normalmente na natureza (Capítulo 9), ou então podem processar-se por ação de agentes externos.

Amplificação gênica consiste no aumento considerável (pode chegar até 1.000 vezes) do número de determinadas sequências gênicas, normalmente existentes com apenas poucas cópias no genoma. Como exemplos de genes normalmente amplificados, podem ser citados os pufes de DNA dos cromossomos de certos insetos dípteros e os genes para as histonas e para os rRNA.

O caso mais bem conhecido de amplificação gênica por agente externo é aquele induzido pelo fármaco anticanceroso metotrexato, que amplifica o gene da hidrofolato redutase, enzima que participa da síntese do DNA e que é inibida pelo mesmo fármaco. Esse fenômeno, observado também em cultura de tecidos, com vários outros fármacos, tem importância médica, pois explica a resistência que certos pacientes desenvolvem a determinados medicamentos após a primeira série do tratamento.

A amplificação de um oncogene existente na célula pode ser a causa de um tumor, como ocorre no neuroblastoma, tumor no qual foi descrita uma forte amplificação do oncogene N-myc.

O processo de replicação do DNA é muito preciso, mas pode gerar doenças se os poucos erros cometidos não forem corrigidos

No Capítulo 8, foram citados mecanismos pelos quais os erros de replicação são corrigidos, visando obter a alta fidelidade necessária para a estabilização das espécies. Esses mecanismos, de maneira geral, efetuam a reparação da grande maioria dos defeitos que ocorrem na replicação.

Contudo, falhas nesses mecanismos de reparação podem produzir doenças, e uma bem conhecida é o *xeroderma pigmentosum*. Essa doença é autossômica e recessiva, e é caracterizada por alta sensibilidade aos raios UV acompanhada de aumento considerável da incidência de câncer de pele.

Alterações na tradução são pouco conhecidas

O processo de tradução é muito complexo e depende de diversos componentes celulares, como o rRNA (RNA ribossômico), o mRNA (RNA mensageiro) e o tRNA (RNA de transferência). A perda dos ribossomos é um sinal precoce, inespecífico, de degeneração celular provocada por inúmeros agentes tóxicos e causa, certamente, uma lesão na tradução.

Muitas proteínas passam por inúmeras modificações pós-traducionais após a síntese das cadeias de aminoácidos

Além de algumas proteínas simples, as proteínas conjugadas (glicoproteínas, lipoproteínas etc.) passam por importantes modificações pós-traducionais, que são frequentemente complexas, como já foi analisado no Capítulo 10 a respeito dos processos de glicosilação, fosforilação, sulfatação e proteólise limitada. Esses processos, responsáveis pela diversidade estrutural e funcional das proteínas, quanto perturbados, provocam inúmeras doenças. Como exemplo, pode ser citado o colágeno, que tem uma patologia excepcionalmente rica não só porque existem vários genes responsáveis pela síntese de seus vários tipos, mas também porque, após a sua tradução, alguns tipos de colágeno passam por quase uma dezena de modificações, a maioria delas dependentes de atividade enzimática. Assim é que a molécula de colágeno passa por processos pós-traducionais de hidroxilações, glicosilações, oxidações e proteólises limitadas que ocorrem no interior das células que sintetizam colágeno e, também, no meio extracelular. Essa complexidade de alterações pós-traducionais explica a patologia rica e variada do colágeno, exemplificada pelas síndromes de Ehlers-Danlos, da qual são conhecidos, no momento, oito tipos. O mecanismo molecular de algumas dessas síndromes já é bem conhecido.

Outro exemplo é a doença das células I (*inclusion cell disease*), cujos enfermos apresentam células com inclusões citoplasmáticas, nanismo e retardamento mental. Como foi estudado no Capítulo 10, ela é causada por deficiência da enzima responsável pela fosforilação de glicoproteínas no aparelho de Golgi, fosforilação essa essencial na síntese de enzimas lisossômicas.

Os processos de regulação das atividades gênicas e enzimáticas são de grande importância para a homeostase

A regulação das atividades gênicas e enzimáticas foi tratada nos Capítulos 3 e 9, e por elas se percebe a importância de moléculas informacionais nesses processos. Essas moléculas são de natureza variada, podendo ser hormônios proteicos, esteroides, fatores de crescimento, metabólitos e íons (como o Na^+, K^+ e Ca^{2+}). Como esperado, o funcionamento defeituoso desses inúmeros e complexos sistemas reguladores é causador de uma rica patologia. É interessante observar que, quando um parâmetro fisiológico é de grande importância para a homeostase, ele é frequentemente regulado por mais de um mecanismo, assegurando assim um controle mais eficiente. É o caso, por exemplo, da regulação do teor de cálcio e de glicose no sangue, que são controlados cada um por dois hormônios

de ação antagônica, a saber: calcitonina e paratormônio, para o cálcio, e insulina e glucagon, para a glicose. A calcitonina faz a concentração de cálcio baixar no sangue, enquanto o paratormônio tem efeito oposto. Quanto à concentração sanguínea de glicose (glicemia), ela é elevada pelo glucagon e reduzida pela insulina.

Defeitos nas proteínas estruturais também podem causar doenças

Apesar de ter sido conferida maior ênfase às enzimas na gênese das doenças, neste capítulo, as proteínas estruturais defeituosas, por deficiência gênica ou agressão ambiental, também causam doenças. A seguir serão mencionados alguns exemplos bem estudados.

Um deles refere-se a um tipo de diabetes descrito no roedor *Acomys (um gênero de roedores encontrado principalmente na Ásia e na África)* em razão da carência de microtúbulos citoplasmáticos nas células produtoras de insulina. Os microtúbulos são importantes para o transporte intracitoplasmático dos grânulos de secreção e, quando ausentes, impossibilitam a secreção de insulina pelas células β das ilhotas, provocando o diabetes.

O escorbuto, causado por carência de ácido ascórbico (vitamina C), é caracterizado por defeito no colágeno, e ocorre porque essa vitamina é um cofator necessário à síntese das fibras colágenas.

Doenças podem ser causadas por defeitos na síntese ou na degradação de componentes celulares

Processos defeituosos de degradação dos componentes celulares, processos esses essenciais para a renovação, e que ocorrem em todos os componentes celulares, com exceção do DNA, podem, também, levar a uma série de doenças. Como a degradação das macromoléculas celulares ocorre em grande parte nos lisossomos, as doenças por falta de enzimas lisossômicas são as mais bem estudadas. As doenças lisossômicas mais conhecidas resultam da degradação incompleta das glicosaminoglicanas, chamadas de mucopolissacaridoses (mucopolissacarídio é o termo usado antigamente para as glicosaminoglicanas) e dos glicoesfingolipídios, chamadas de lipoidoses (lipoides, antigo nome para glicoesfingolipídios). Nessas doenças, a digestão das respectivas moléculas é incompleta, resultando no acúmulo intracelular dos produtos não digeridos completamente. Esse acúmulo ocorre em diferentes células, como, por exemplo, nas células do sistema nervoso, fígado, músculos, macrófagos e leucócitos. Em muitas dessas doenças, já se conhece a enzima defeituosa, o que abre a perspectiva da sua cura quando as técnicas de transferência gênica, já utilizadas em animais, puderem ser aplicadas à espécie humana.

Resumo

As células eucariontes apresentam complexos e sensíveis mecanismos que regulam suas atividades. Os ácidos nucleicos e proteínas, em razão de sua alta diversidade estrutural e funcional, desempenham papéis relevantes nesses mecanismos. Consequentemente, as alterações qualitativas e quantitativas nos ácidos nucleicos se refletem, diretamente, na produção de proteínas por meio dos processos de replicação, transcrição e tradução. Após a tradução, que ocorre nos polirribossomos, os processos de modificações pós-traducionais das proteínas, que se processam principalmente no retículo endoplasmático rugoso e no aparelho de Golgi, contribuem muito para a diversificação estrutural e funcional das proteínas. Alterações nos ácidos nucleicos e nas proteínas enzimáticas e estruturais são as causas de grande número de doenças já conhecidas, número esse que aumenta em ritmo crescente. Quando certos parâmetros celulares são de importância fundamental para a manutenção da homeostase, as células geralmente têm mais de um mecanismo de regulação, garantindo assim um controle mais sensível e preciso das atividades celulares. Além das múltiplas doenças causadas por defeitos na síntese dos ácidos nucleicos e proteínas, ocorrem também doenças causadas por alterações na degradação de macromoléculas, que se processa normalmente na maioria dos componentes celulares. Várias doenças são decorrentes de alterações localizadas nas organelas celulares e frequentemente, além de modificações bioquímicas, são acompanhadas por alterações morfológicas dessas estruturas.

Bibliografia

Cox, T.M. and Sinclair, J.: *Molecular Biology in Medicine*. Blackwell, 1997.
Kaplan, J.C. and Delpech, M.: *Biologie Moleculaire et Medicine*. Flammarion, 1990.
Leder, P., Clayton, D.A. and Rubenstein, E.: *Introduction to Molecular Medicine*. Sci. Amer. Books, 1994.
Murray, R.K. *et al.*: *Harper's Biochemistry*, 24th ed. Appleton & Lange, 1996.
Perez-Tamayo, R.: *Mechanism of Disease*. Year Book Medical Pub., 1985.
Ross, D.W.: *Introduction to Molecular Medicine*, 2nd ed. Springer, 1996.
Trent, R.J.: *Molecular Medicine. An Introduction Text for Students*. Churchill Livingstone, 1993.
Underwood, J.C.E.: *General and Systematic Pathology*. Churchill Livingstone, 1992.

16 Célula Cancerosa

Roteiro

- No organismo saudável, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas
- Nos organismos unicelulares, as células competem umas com as outras, predominando as mais eficientes
- Nos seres multicelulares, ao contrário, as células não podem competir umas com as outras, mas devem funcionar em um processo de colaboração mútua, para manter a integridade dos tecidos
- O câncer se forma a partir de uma única célula cujo DNA foi danificado
- A mutação inicial é transmitida para as células seguintes que vão acumulando outras mutações
- As mutações sucessivas das descendentes da célula única inicial originam a célula cancerosa
- A célula cancerosa se caracteriza por proliferar continuamente, destacar-se do local inicial e espalhar-se pelo organismo, gerando as metástases, muitas vezes em órgãos distantes
- Todos os agentes que danificam o DNA são mutagênicos e podem levar ao surgimento de células cancerosas
- Alguns vírus também podem participar da formação de células cancerosas
- Número anormal de cromossomos e cromossomos defeituosos são frequentes nas células cancerosas
- A célula cancerosa geralmente é rica em ribossomos (citoplasma basófilo), tem o citoesqueleto desorganizado e apresenta irregularidade no tamanho e na coloração do núcleo celular
- Os genes que participam do surgimento de células cancerosas estudados são os oncogenes e os genes supressores de tumores.

As células que constituem o corpo dos organismos multicelulares formam uma comunidade de tecidos altamente organizados e regulados por controles internos e externos ao tecido, como hormônios e fatores de crescimento.

Na sua formação, os órgãos só crescem até atingirem determinado tamanho, pois suas células obedecem aos sinais recebidos para entrar na fase G-zero do ciclo celular e interromper a proliferação. Um controle rígido sobre a proliferação celular também é exercido nos órgãos que, no organismo adulto, se regeneram após uma lesão. As células se multiplicam apenas o suficiente para reconstituírem o órgão com aproximadamente o mesmo tamanho que apresentava antes da lesão.

Enquanto as células dos organismos unicelulares competem umas com as outras, predominando as mais eficientes, nos organismos multicelulares não existe competição, mas colaboração entre as células, o que é essencial para a sobrevivência de um organismo multicelular complexo. As células cancerosas, no entanto, não se submetem a esse esquema de cooperação. São células com o DNA danificado e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular.

O câncer surge de uma única célula que sofreu mutação, multiplicou-se por mitoses e suas descendentes foram acumulando outras mutações que se foram somando, até darem origem a uma célula cancerosa em consequência da ação conjunta dessas mutações. O acúmulo de mutações por uma célula e suas descendentes é um processo lento, e isso, provavelmente, explica a maior incidência de câncer nas pessoas idosas.

A célula cancerosa prolifera muito, perde a capacidade de aderência, secreta enzimas que atacam a matriz extracelular, invade os tecidos vizinhos (Figura 16.1), penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos e se espalha pelo organismo, estabelecendo-se e proliferando em locais distantes de sua origem, nos quais produz tumores secundários: as metástases (Figura 16.2). As células malignas secretam moléculas que estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos capilares, promovendo uma angiogênese (neoformação vascular).

Os tumores malignos (cânceres) originam metástases; os benignos permanecem localizados

A princípio, chamava-se de tumor qualquer aumento de volume localizado em um órgão (edema), independentemente da causa. Com frequência, o edema resulta de um processo inflamatório; porém, atualmente, o termo é empregado para designar a proliferação celular anormal, cuja denominação correta é neoplasia (novo crescimento). Geralmente, chama-se de câncer os tumores malignos, para distingui-los dos tumores benignos. No tumor benigno (Figura 16.2), as células permanecem localizadas, prejudicando apenas o órgão em que se originou o tumor e os tecidos adjacentes, que podem ser comprimidos. Assim, os tumores benignos geralmente são curados facilmente pela cirurgia. Já o tratamento cirúrgico dos tumores malignos só é eficaz se realizado antes de ocorrerem as metástases.

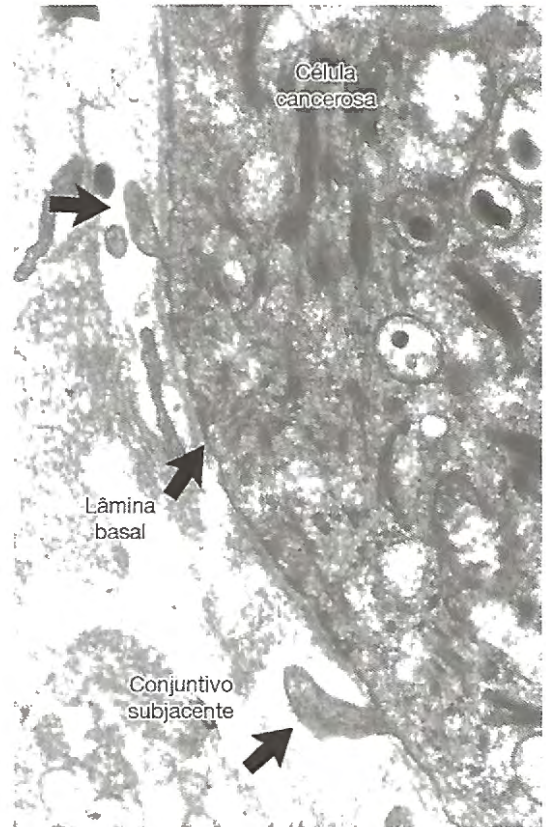



Figura 16.1 ▪ Micrografia eletrônica da interface de uma célula cancerosa (carcinoma espinocelular) com o tecido conjuntivo subjacente. Observe extensões celulares atravessando a lâmina basal (*setas*) iniciando assim a invasão do tecido conjuntivo. Essa capacidade invasiva é característica dos tumores malignos.

Dependendo do tumor, as metástases mostram preferência por determinados tecidos

Nem todas as células que se separam do tumor e entram no sangue ou na linfa conseguirão completar com sucesso sua trajetória para formar metástases. A maioria delas é destruída por diversos processos, como ruptura na travessia da parede dos vasos, ataque pelas moléculas da defesa imunitária e fagocitose por macrófagos. Ao atingirem os tecidos e depois de proliferarem para formar um pequeno tumor, as metástases estimulam a formação de novos capilares sanguíneos, para garantir o suprimento de nutrientes, fatores de crescimento e oxigênio, e ter uma via de eliminação dos refugos do metabolismo, que são levados pelo sangue para os órgãos de excreção. Não se formam metástases nos tecidos que não oferecem condições para o estabelecimento de uma circulação sanguínea, como a cartilagem, por exemplo. Em contrapartida, há órgãos muito ricamente vascularizados, com abundantes capilares sanguíneos, como o baço e o tecido muscular estriado, que só muito raramente são sede de metástases.

Muitos tumores originam metástases preferencialmente em determinados tecidos, o que indica nem sempre se tratar de um processo ao acaso. Por exemplo, há cinco carcinomas – os tumores de rim, tireoide, pulmão, mama e próstata – que, quase sempre, provocam metástases no tecido ósseo. Carcinoma é tumor originado de tecido epitelial.

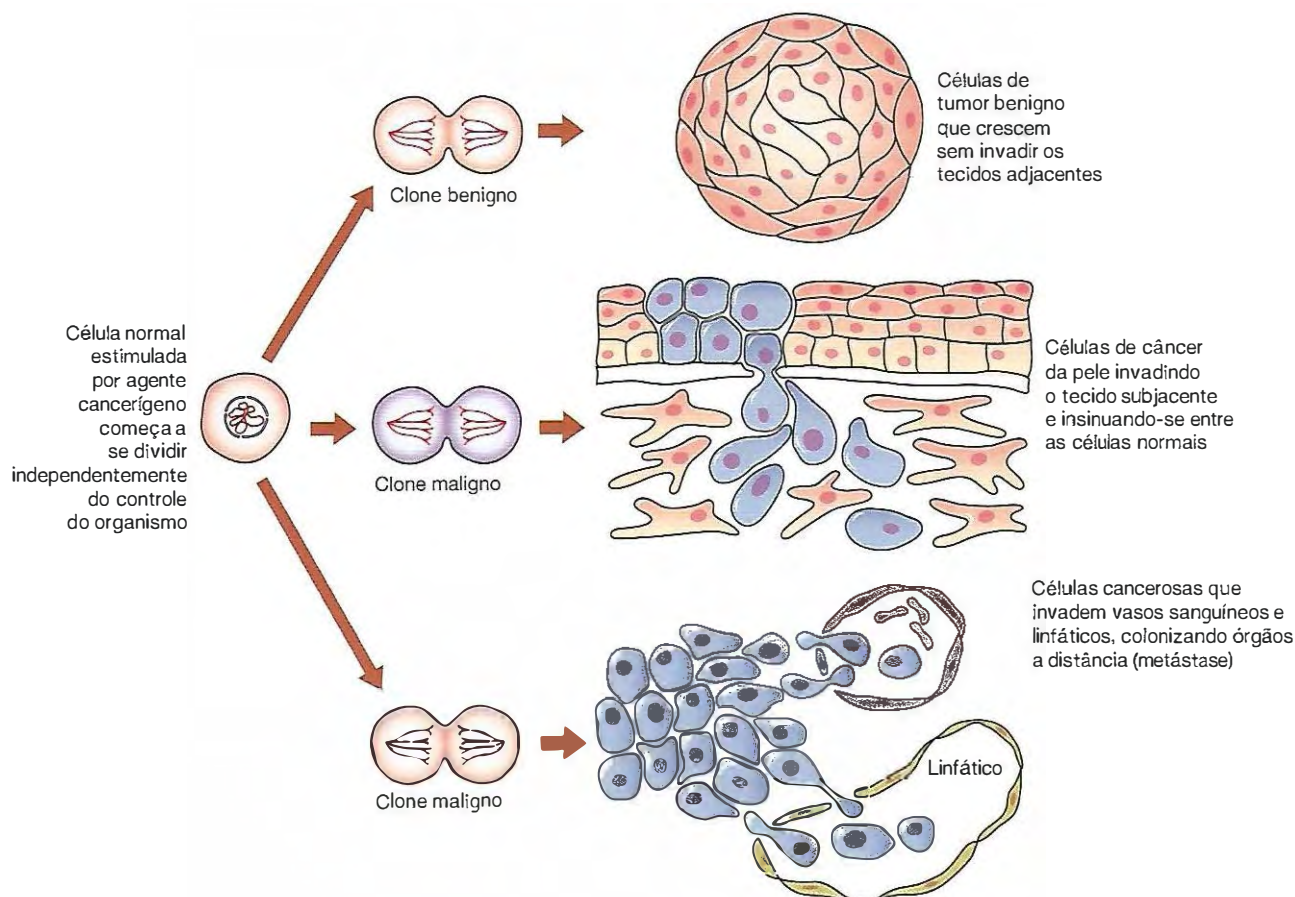



Figura 16.2 ▪ Desenhos esquemáticos que mostram algumas diferenças entre o tumor benigno (*desenho do alto*) e os tumores malignos (*desenhos de baixo*). Observe que o tamanho das células e dos núcleos é mais regular no tumor benigno. A variabilidade nuclear e a capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de se propagar pelos vasos sanguíneos e linfáticos, originando metástases, são características dos tumores malignos, nos quais as células perdem a capacidade de aderência mútua, invadem os vasos e são levadas pelo sangue e pela linfa, sendo levadas a colonizar órgãos distantes (metástases).

Diferentes agentes podem causar câncer

A transformação da célula normal em cancerosa ocorre por alteração de seu DNA, com a participação de vírus, substâncias químicas do ambiente ou da alimentação e agentes físicos como determinados tipos de radiação.

A primeira indicação sobre a existência de substâncias cancerígenas (causadoras de câncer) foi observada em 1775, quando se atribuiu à fuligem a alta incidência de câncer da pele nos limpadores de chaminés. Atualmente, são conhecidas mais de 200 moléculas cancerígenas, a maioria constituída de hidrocarbonetos policíclicos.

A única propriedade comum a todos os cancerígenos é a capacidade de causar dano ao genoma celular. Mas a indução inicial, que danifica o DNA da célula, é complementada por outros agentes, geralmente estimuladores da multiplicação celular, o que aumenta a probabilidade de novos danos ao DNA durante as numerosas replicações.

O estudo de células cultivadas *in vitro* tem esclarecido muitos aspectos da biologia molecular do ciclo celular normal e de suas alterações no câncer

O câncer é formado por células com defeito no ciclo mitótico, o que pode ser estudado mais facilmente em células cultivadas do que nos tumores do corpo de um animal.

Esses estudos geralmente são feitos a partir de células normais transformadas em cancerosas nas culturas, pela ação de moléculas cancerígenas, de radiação ou de vírus causadores de tumores. As células normais cultivadas se dividem apenas um determinado número de vezes, geralmente 50 a 60 vezes, mas as células transformadas são "imortais" e se multiplicam indefinidamente. O processo que leva uma célula normal cultivada a se tornar imortal e apresentar características de célula cancerosa se chama transformação (não confundir com a transformação das células bacterianas, explicada no Capítulo 14).

As células normais exibem o fenômeno de inibição por contato, isto é, elas proliferam até formarem uma camada de apenas uma célula de espessura sobre a superfície do frasco de cultivo, quando entram na fase G-zero do ciclo celular. Isso mostra que elas obedecem aos sinais recebidos das células adjacentes. Por sua vez, as células cancerosas proliferam umas sobre as outras, e não em camada única.

As células transformadas se multiplicam facilmente em suspensão em um meio de cultura constituído por um gel fluido, e continuam proliferando mesmo quando seu número é muito elevado no meio de cultura. Células não transformadas geralmente só proliferam aderidas a um substrato sólido, como uma lamínula ou a parede do frasco de cultivo.

Além das células transformadas nas culturas, podem-se cultivar também células cancerosas obtidas diretamente de tumores; porém, os tumores são constituídos por uma população celular muito heterogênea com graus de malignidade diferentes (nem todas passaram pelas mesmas mutações),

enquanto as células transformadas *in vitro* constituem uma população mais homogênea, o que facilita o estudo de sua biologia molecular.

O tipo celular originário influi muito nas características dos diversos tumores

Quase todos os tipos celulares do organismo podem originar tumores. Como existem muitos tipos diferentes de células normais, existem também muitos tipos de células cancerosas, produzindo tumores que diferem acentuadamente quanto ao grau de malignidade e à resposta ao tratamento. Todavia, determinadas células originam tumores com mais frequência do que outras, como, por exemplo, as células que normalmente se dividem muitas vezes. Quanto mais o DNA se replica, maior a possibilidade de mutações, por falhas no processo de síntese da nova molécula de DNA e na reparação do DNA defeituoso. Muitos tumores são originados dos tecidos epiteliais, cujas células geralmente se renovam com frequência. No adulto, cerca da 90% dos tumores derivam de epitélios. Além de sua renovação constante, as células epiteliais que revestem o corpo e as cavidades internas, como boca, vias respiratórias, esôfago e estômago, estão mais sujeitas à ação dos agentes cancerígenos presentes nos alimentos e no ambiente. No caso do revestimento epitelial da superfície do corpo (epiderme), um fator cancerígeno adicional é a radiação ultravioleta da luz solar, que tem atividade mutagênica e, portanto, cancerígena. As células epiteliais da epiderme contêm quantidade variável do pigmento melanina, colocada como um capuz sobre o lado do núcleo celular que está voltado para o exterior, de onde vem a radiação ultravioleta (Figura 16.3). Esse capuz protetor do DNA influi na incidência de câncer da epiderme, que é muito maior nas pessoas de pele clara, cujas células epidérmicas contêm pouca melanina, do que nas pessoas com pele escura, rica em melanina.

Tumores malignos originados de células epiteliais de revestimento são geralmente chamados de carcinomas (Figura 16.4). Os tumores originados das células epiteliais secretoras recebem o nome de adenomas, quando são benignos, chamando-se adenocarcinomas, quando malignos.

Os tumores originados de tecido conjuntivo são raros nos adultos, sendo mais comuns em crianças e adolescentes. Quase sempre, o nome dos tumores de tecido conjuntivo, quando são benignos, se forma pelo nome da célula originária adicionado pela terminação -oma, como o fibroma (originado de fibroblasto), o osteoma (originado de osteoblasto) e o condroma (originado de células da cartilagem). Os tumores malignos dos tecidos conjuntivos são chamados sarcomas; são exemplos o osteossarcoma (originado de osteoblasto) e o condrossarcoma (originado de células da cartilagem).

Características morfológicas, moleculares e funcionais da célula cancerosa

Há muitas diferenças morfológicas, moleculares e funcionais entre uma célula cancerosa e uma normal. Todavia, do mesmo modo que há grandes diferenças entre os diversos tipos de células normais, também existem muitas diferenças entre as células cancerosas. Outra dificuldade é separar as características fenotípicas da célula cancerosa que são responsáveis por sua agressividade, das que são secundárias, resultantes de características primárias.

Uma das características que chama a atenção é o polimorfismo das células tumorais. Em um mesmo tumor, as células

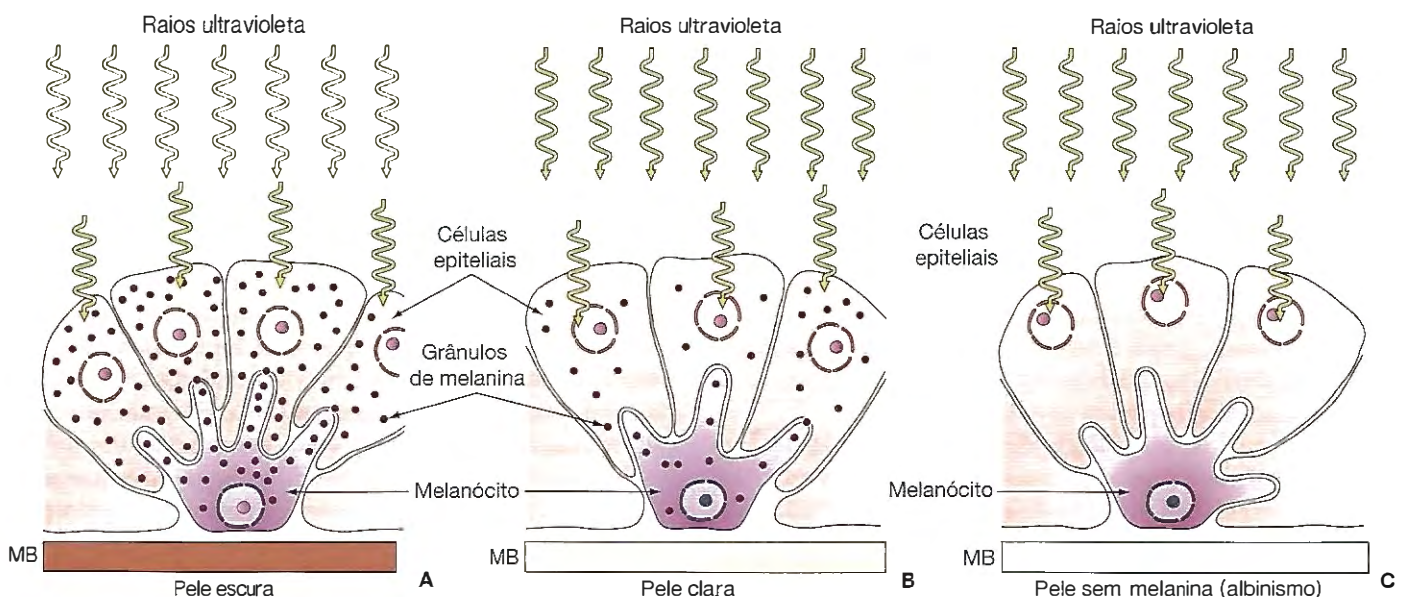



Figura 16.3 ▪ Desenho esquemático que ilustra a proteção exercida pelo pigmento melanina contra a ação deletéria dos raios ultravioleta da luz do sol sobre as células da epiderme, camada mais superficial da pele. Os grânulos de melanina se localizam preferencialmente na região supranuclear, formando um capuz protetor para o DNA. Os raios ultravioleta podem lesionar o DNA, levando a mutações sucessivas, que acabam tornando a célula cancerosa. Em **A**, a ilustração representa a pele escura, na qual a proteção oferecida pela melanina é máxima. As pessoas de pele clara, como ilustrado em **B**, têm menos melanina e epiderme mais sensível aos raios ultravioleta. No albinismo, ocorre ausência total de melanina em todas as células (**C**), o que torna a pele dos albinos muito sensível ao sol. Em consequência, a incidência de câncer da pele é baixa nas pessoas de pele escura, maior nas de pele clara e alta nos albinos. Nas três ilustrações, MB indica a membrana basal que separa a epiderme da segunda camada da pele, a derme, não representada no desenho.

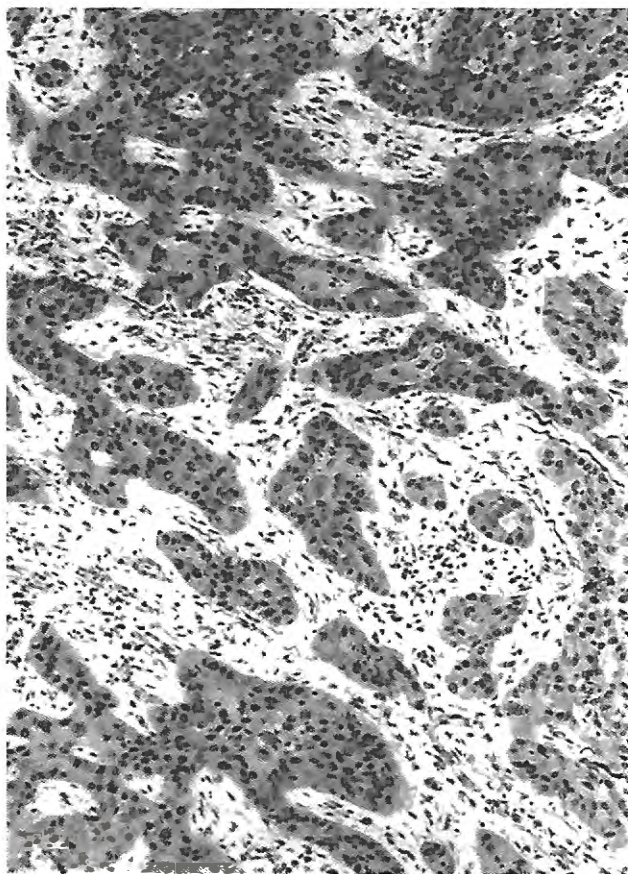



Figura 16.4 ▪ Fotomicrografia de um carcinoma da epiderme invadindo o tecido conjuntivo da derme. Normalmente, o tecido epitelial da epiderme estaria claramente separado do conjuntivo subjacente. Esse poder invasivo é uma característica dos tumores malignos (cânceres). Aumento médio.

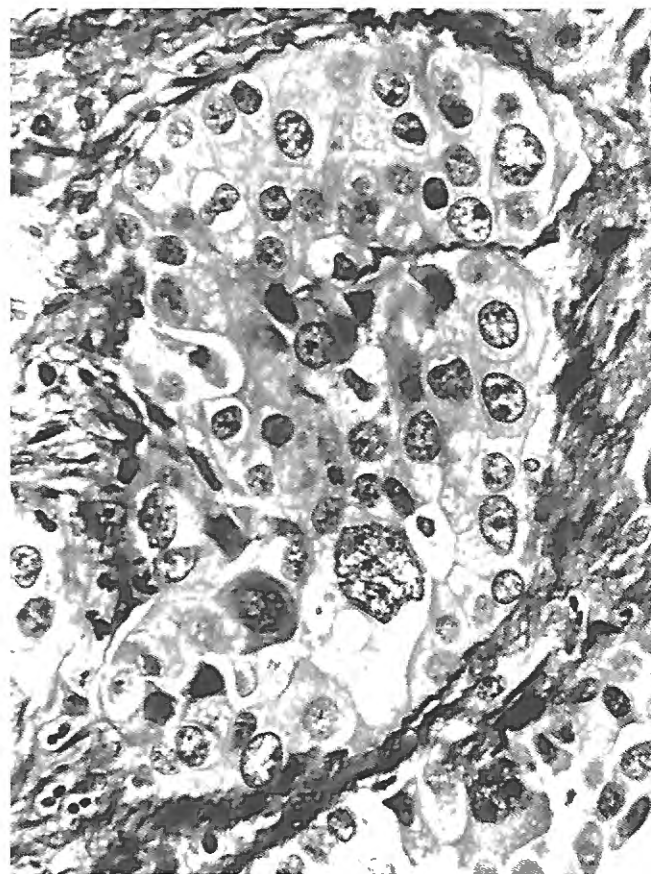



Figura 16.5 ▪ Fotomicrografia de corte de um tumor constituído por células indiferenciadas, de difícil diagnóstico. Observe a diversidade na forma, no tamanho e na coloração dos núcleos celulares. Aumento médio.

diferem muito em forma e tamanho. Em geral, são mais volumosas do que as normais que lhe deram origem, e muitas são aneuploides, isto é, contêm uma quantidade anormal de cromossomos, que não é um múltiplo do número diploide. Em razão da poliploidia (poliploide é a célula com quantidade de DNA que é um múltiplo do valor diploide) e da aneuploidia, um mesmo tumor apresenta núcleos de diversos tamanhos (Figura 16.5), com alteração da relação núcleo-citoplasma. De modo geral, há variações do volume e do número de nucléolos, surgimento de maior número de cromossomos e aberrações da forma nuclear. Esses núcleos com frequência se coram fortemente, aparecendo escuros nos cortes histológicos. No entanto, distinguem-se também alguns núcleos com aspecto vesicular, com cromatina frouxa e hipocromáticos. Células binucleadas ou polinucleadas também são frequentes, e as mitoses são abundantes (com alta frequência de mitoses anômalas).

Além das frequentes alterações no número de cromossomos, a maioria das células cancerosas apresentam modificações na forma e no tamanho de determinados cromossomos e alterações nas bandas cromossômicas. Contudo, embora o câncer seja decorrente de alterações no DNA, nem sempre as alterações cromossômicas são visíveis ao microscópio; por exemplo, as mutações punctiformes que ativam os oncogenes *ras* ou inativam o gene *RB* (esses genes são descritos adiante, neste capítulo) são modificações tão pequenas que não podem ser detectadas no cariótipo, sendo evidenciadas pelas técnicas de biologia molecular.

Como se multiplicam muito, as células cancerosas geralmente têm o citoplasma basófilo, em razão da riqueza em ribossomos, o que acontece com todas as células em proliferação. O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são em geral muito pouco desenvolvidos, e as mitocôndrias e lisossomos, pouco numerosos.

As maiores alterações citoplasmáticas das células cancerosas acontecem no citoesqueleto. As células normais têm microtúbulos, filamentos intermediários e filamentos de actina bem organizados por todo o citoplasma, mas, nas células cancerosas, o citoesqueleto é reduzido ou completamente desorganizado, com a concentração dos microtúbulos e filamentos intermediários nas proximidades do núcleo, enquanto os filamentos de actina se localizam principalmente na região cortical do citoplasma, sob a membrana celular. Esses filamentos de actina devem participar do aumento da motilidade e da facilidade de migração que se observa nas células cancerosas.

Também ocorrem muitas modificações na superfície celular, com o surgimento de moléculas novas, principalmente proteínas. Por exemplo, as células cancerosas geralmente apresentam maior quantidade de proteínas transportadoras de glicose para o citoplasma em suas membranas plasmáticas, o que constitui uma vantagem para a nutrição e a sobrevivência dessas células. Também aparecem antígenos fetais, o que é considerado um indício de desdiferenciação da célula tumoral. Os antígenos fetais existem no feto, mas desaparecem com a maturidade celular. Foi demonstrado que, nas células cance-

rosas, as proteínas da membrana têm maior mobilidade, o que pode ser decorrente de uma menor fixação pelo citoesqueleto. Como é de se esperar, pelo seu comportamento, as células cancerosas são deficientes em estruturas juncionais (estudadas no Capítulo 5).

A maioria das células normais apresenta um sistema molecular de superfície favorecendo, durante o desenvolvimento embrionário, que a célula reconheça seu microambiente e fixe suas moléculas de adesão às de outras células ou à matriz extracelular. Se a célula normal falha nesses tipos de adesão, ela automaticamente segue a via da morte celular programada (apoptose), sendo eliminada. Isso não acontece nas células cancerosas, nas quais o programa de autoeliminação, em caso de erro grave, geralmente está desativado.

Nos tumores malignos, embora as células se multipliquem muito, o processo de diferenciação celular geralmente é interrompido, e a célula deixa de fabricar as proteínas típicas de sua equivalente normal. Já nos tumores benignos, a proliferação celular é seguida de diferenciação. Por isso, muitos tumores benignos originados de glândulas endócrinas secretam grandes quantidades de hormônios, o que pode causar sérios distúrbios no organismo.

Geralmente, o ritmo de crescimento dos tumores se relaciona com seu grau de diferenciação. Quanto mais indiferenciada a célula cancerosa, maior sua malignidade, sendo também mais difícil e, às vezes, impossível identificar o tecido de origem.

Cada tumor é um clone celular anormal que se formou por sucessivas alterações no DNA

Como já mencionado anteriormente, a célula cancerosa é proveniente de uma única célula normal que sofreu uma mutação inicial e formou um clone de células que foram acumulando outras mutações, até se tornarem malignas.

O tumor se forma progressivamente, por etapas, por meio de mutações que tornam as células do clone cada vez menos sensíveis aos estímulos reguladores recebidos do organismo e cada vez mais aptas a invadirem outros tecidos. Embora descendentes de uma célula ancestral única, há grandes diferenças morfológicas e moleculares entre as células de um mesmo tumor. Elas apresentam também diferenças entre seus genes, e nem todas têm a mesma malignidade, porém as mais malignas tendem a predominar, por serem mais aptas e vencerem no processo competitivo com as outras células do mesmo clone.

Os genes que participam da formação de tumores são principalmente os que, nas células normais, estão envolvidos com o controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose (Capítulo 9).

Principais genes que participam da formação de tumores

Os mais estudados são os genes supressores de tumores ou antioncogenes e os oncogenes.

Não se conhece o mecanismo de ação de todos os genes supressores de tumores, porém, alguns codificam proteínas que mantêm as células em G-zero, portanto fora do ciclo mitótico e incapazes de se tornarem malignas. As primeiras indicações da existência desses genes foram obtidas em culturas de células, quando se observou que muitas vezes a fusão de uma célula maligna com uma célula normal originava uma célula híbrida, sem malignidade. Essa observação mostrou que a célula normal produz moléculas que eliminam a malignidade. Posteriormente, foi observado que, em determinados tipos de tumores, faltavam pequenos segmentos específicos de determinados cromossomos e foram estudadas as proteínas produzidas por esses segmentos nas células normais. Essas proteínas se mostraram supressoras de tumores. Os genes supressores de tumores são recessivos, isto é, o efeito cancerígeno só aparece quando eles estão ausentes ou são defeituosos nos dois cromossomos do genoma.

Os oncogenes codificam proteínas que promovem a multiplicação desordenada das células, que se convertem em malignas. Foram descobertos pelo estudo de tumores malignos produzidos por vírus com genoma de RNA. Esses vírus contêm a enzima transcriptase reversa, que copia seu RNA em filamentos duplos de DNA, o qual é incorporado ao genoma da célula hospedeira. Determinados vírus de RNA levam oncogenes que transformam a célula normal em célula maligna. Contudo, logo foi descoberto que esses genes de RNA transportados pelos vírus, na realidade, são cópias, muitas vezes defeituosas, de genes (DNA) celulares, que se incorporaram ao genoma (RNA) viral em infecções anteriores. Em condições normais, são genes que participam do controle da proliferação celular para constituir os tecidos normais do organismo. Quando atuam nos momentos certos e de modo controlado, esses genes são chamados proto-oncogenes. Quando estão alterados e entram em atividade codificando suas proteínas nas ocasiões em que não são necessárias, ou quando formam proteínas modificadas, originam tumores e passam a ser denominados oncogenes. A designação de proto-oncogene para um gene normal e essencial para os organismos não parece ser a melhor, mas se explica porque eles foram descobertos depois de conhecidas suas cópias defeituosas, os oncogenes.

Os oncogenes, ao contrário dos genes supressores de tumores, são dominantes. Basta uma cópia do oncogene no genoma para causar a transformação da célula normal em célula cancerosa, encaminhando-a na direção de formar um tumor, mesmo quando a outra cópia do gene é normal.

A maioria dos tumores tem mutações tanto em oncogenes como em genes supressores de tumores e, provavelmente, também em outros genes.

Genes supressores de tumores

Praticamente todos os tumores malignos conhecidos são constituídos por células com mutações em diversos genes supressores de tumores, ou ausência completa desses genes. A Tabela 16.1 apresenta os principais exemplos conhecidos desses genes.

O primeiro a ser estudado foi o gene do retinoblastoma, um tumor maligno da retina que acomete crianças, pois, nos adultos, as células que originam esse tumor não mais proliferam (estão em G-zero). Estudos epidemiológicos mostraram que

Tabela 16.1 ▪ Alguns exemplos de genes supressores de tumores.

Genes	Detectados com mutações nos tumores malignos*
RB	Retinoblastoma
p53	50% da totalidade dos tumores
p16	Adenocarcinoma do pâncreas e muitos outros tumores
BRCA 1	Tumores da mama (frequentes) e do ovário (raros)
BRCA 2	Tumores da mama
APC	Carcinoma do cólon (intestino grosso)
VHL	Carcinoma do rim, hemangioblastoma (tumor de vaso sanguíneo)

*É possível que pesquisas mais amplas mostrem alterações desses genes em outros tumores, além dos citados nesta tabela.

o retinoblastoma é muito raro na população em geral, porém ocorre com alguma frequência nas crianças de determinadas famílias, indicando a herança de uma tendência para esse tumor. O gene relacionado com o retinoblastoma foi chamado *RB*. Em todas as células do corpo (não apenas nas da retina) das crianças com retinoblastoma hereditário, foi observada a falta de pequeno pedaço de um cromossomo 13, enquanto o outro cromossomo 13 do par estava intacto. Se a herança fosse dominante, todas as crianças com deleção (remoção de um ou vários nucleotídios do DNA do cromossomo) no cromossomo 13 teriam o tumor. Isso não acontece porque o cromossomo intacto produz quantidade suficiente do fator supressor de tumor, a proteína codificada pelo gene *RB*, designada como pRB (Figura 16.6). Essas crianças, entretanto, têm uma grande tendência para o retinoblastoma porque nelas basta a mutação em um cromossomo para que o tumor surja, enquanto, nas pessoas da população normal (dois cromossomos 13 sem deleção), é preciso que ocorram mutações nos dois genes. Portanto, na população normal o retinoblastoma é extremamente raro e, quando ocorre, geralmente tem lugar apenas em uma retina, afetando apenas um globo ocular. Isso acontece porque a probabilidade de mutações nos dois genes *RB* e nas duas retinas é muito pequena. Nas crianças com um cromossomo 13 já defeituoso, basta uma modificação no cromossomo normal para causar o tumor. Por isso, o retinoblastoma incide em 10% das crianças das famílias com deleção em um cromossomo 13, e geralmente tem lugar nas duas retinas, porque o defeito cromossômico hereditário é encontrado em todas as células do organismo. Nesses casos, uma deleção ou mutação encontra o outro cromossomo já defeituoso e, portanto, meio caminho já está andado.

As pessoas que herdam um cromossomo 13 com deleção do gene *RB*, além da propensão para retinoblastoma na infância, têm também tendência para outros tumores, como o osteossarcoma, um tumor maligno de osteoblastos (células do tecido ósseo) mais frequente em pessoas jovens.

Outro gene supressor muito estudado é o *p53*, assim denominado porque codifica uma proteína com peso molecular de 53 kDa (quilodáltons). A ausência de um alelo desse gene determina a síndrome de Li-Fraumeni, cujas vítimas apresentam uma incidência muito alta de determinados tipos de câncer, incluindo o câncer das glândulas mamárias (câncer de mama) e leucemias. As leucemias são neoplasias malignas de glóbulos brancos do sangue. Como ocorre no retinoblastoma hereditário, as pessoas com a síndrome de Li-Fraumeni herdam apenas uma cópia anormal do gene supressor *p53* e, portanto, são muito sujeitas a tumores malignos pela mutação que afeta o único gene *p53* normal restante. Foi demonstrado,

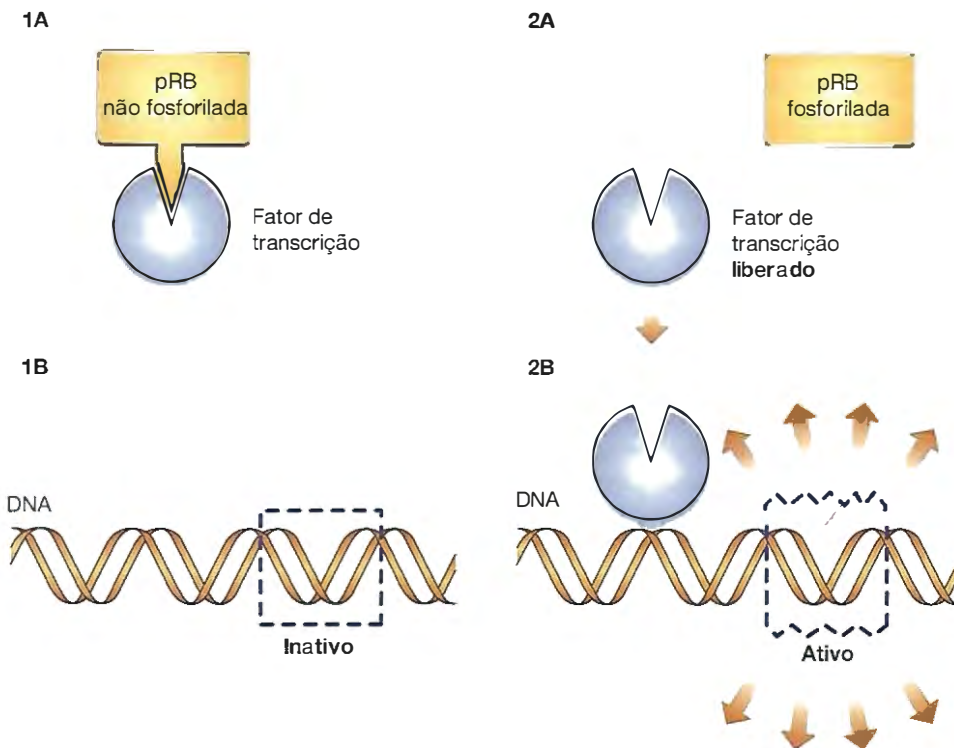



Figura 16.6 ▪ Quando não está fosforilada, a proteína (pRB) do gene *RB* se liga a um fator de transcrição e impede que o DNA transcreva os genes necessários para o andamento do ciclo celular (**1A** e **1B**, nos desenhos). A fosforilação da proteína pRB modifica sua configuração, libera o fator de transcrição que ativa o DNA (**2A** e **2B**) e a multiplicação celular. Se a proteína pRB estiver alterada, por mutação, pode deixar de se ligar ao fator de transcrição, e os genes cujas proteínas fazem com que as células avancem no ciclo celular, passando da fase G_1 para a fase S, tornam-se permanentemente ativados, causando a proliferação celular anormal (tumor).

experimentalmente, que camundongos sem as duas cópias do gene *p53* se desenvolvem normalmente na vida embrionária e nascem aparentemente normais, porém logo morrem vitimados por uma grande variedade de tumores, lembrando o que acontece em humanos portadores do fenótipo multicâncer que caracteriza a síndrome de Li-Fraumeni.

Aproximadamente 50% de todos os tumores malignos humanos apresentam mutação ou deleção do gene *p53*, o que mostra a importância desse gene supressor. Além disso, esses tumores com *p53* defeituoso são mais invasivos e provocam muitas metástases, o que indica maior gravidade da doença. Já foram identificadas cerca de mil mutações diferentes no gene *p53* de células tumorais humanas, uma indicação de que a atividade da proteína codificada pelo gene *p53* é muito sensível a qualquer pequena modificação que ocorra em sua sequência de aminoácidos.

O gene *p53* normal suprime a formação do câncer por meio de diversos mecanismos, como impedindo, com a ajuda de proteínas intermediárias, que as células que sofreram danos no DNA entrem na fase S do ciclo mitótico, até que o DNA seja corrigido; é possível também que a proteína p53 auxilie de algum modo na correção do DNA; outra função desse gene relaciona-se com sua capacidade de desencadear os mecanismos de apoptose quando existe dano no DNA. O gene *p53* é considerado uma espécie de defensor permanente do DNA. Seu papel como gene supressor de câncer decorre de sua atividade sobre as células com DNA defeituoso, que é o caso de todas as células cancerosas.

Uma vez que é capaz de provocar apoptose, o gene *p53* desempenha um papel central no tratamento do câncer pela radioterapia, que ataca de preferência as células cancerosas, embora as células normais também sejam afetadas, principalmente as que se renovam constantemente. Durante muito tempo se acreditou que as células cancerosas são mais sensíveis ao tratamento médico pela radiação apenas porque se dividem muito, porém diversos estudos mostraram que as células normais são mais resistentes, porque interrompem o ciclo celular até a correção completa do seu DNA danificado pelo tratamento com radiação. As células cancerosas, ao contrário, têm mecanismos de restauração do DNA menos eficientes. Assim, quando seu DNA é danificado pela radiação, desde que o gene *p53* esteja funcional, elas podem seguir a via da apoptose e serem eliminadas. Isso explica por que as células cancerosas com o gene *p53* danificado são tão resistentes ao tratamento pela radioterapia, enquanto as células cancerosas com *p53* intacto são muito mais sensíveis.

Outros exemplos de genes supressores são os genes *BRCA1* e *BRCA2* (*breast cancer* ou câncer de mama), que predispõem as mulheres aos tumores das glândulas mamárias. O gene *BRCA1* também predispõe ao câncer do ovário, um tumor pouco comum, porém, de alta malignidade, e *BRCA2* parece predispor também aos tumores do pâncreas. Camundongos cujos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram eliminados por engenharia genética não sobrevivem além das fases iniciais da vida embrionária, o que indica a importância desses genes para o desenvolvimento normal. Estatísticas dos EUA mostraram que 0,5% das mulheres têm mutação em uma cópia do gene *BRCA1*, sendo muito suscetíveis ao câncer da mama pela possível mutação no único gene *BRCA1* normal.

Muitas pessoas herdam uma doença que consiste na presença de múltiplos pólipos no cólon (intestino grosso). Esses pólipos são adenomas pré-malignos, conhecidos pela sigla APC (*adenomatous polyposis coli* ou polipose adenomatosa do cólon) originados das células epiteliais secretoras que revestem o cólon. Se não forem removidos por cirurgia, esses pólipos frequentemente se transformam em tumores malignos. As células desses doentes apresentam deleção de um pequeno segmento do cromossomo 5, no qual foi identificado um gene supressor de tumores que recebeu o nome de gene *APC*. As pessoas com deleção de um gene *APC* estão na mesma situação das que têm deleção de um gene *RB*. Basta a mutação do único gene normal para que cesse o efeito protetor dos genes *APC* e aumente muito a possibilidade de o pólipo se transformar em um tumor maligno, provavelmente pelo acúmulo de outras mutações, favorecidas pelo fato de que as células do pólipo normalmente se multiplicam muito para sua própria renovação.

Oncogenes

Os oncogenes codificam proteínas que promovem a perda do controle sobre o ciclo mitótico e levam as células a se tornarem cancerosas. Esses genes resultam de mutações somáticas, são dominantes – ao contrário dos genes supressores, que são recessivos – e não são hereditários. Mutação somática é um defeito no DNA de célula somática durante a vida do indivíduo. Nas doenças hereditárias, o defeito está no DNA dos zigotos. Os oncogenes não causam predisposição para o câncer, mas sim o próprio câncer. Seus equivalentes normais, os proto-oncogenes, têm papel importante no desenvolvimento embrionário, ativando a proliferação das células do embrião e do feto, nos momentos corretos, para que se forme um organismo normal. Desempenham também importante papel na regeneração dos tecidos destruídos por acidente ou doença.

A Tabela 16.2 apresenta alguns proto-oncogenes e os tumores que eles podem causar quando sofrem mutação e se tornam oncogenes.

O oncogene mais frequentemente encontrado nos cânceres humanos é o oncogene *ras* (há variantes, como H-*ras*, K-*ras* e

Tabela 16.2 ▪ Alguns exemplos de proto-oncogenes, genes normais que por mutação, originam oncogenes.

Proto-oncogenes	Detectados com mutações nos tumores
neu	Adenocarcinoma da mama, ovário e estômago
N-*myc*	Neuroblastoma, carcinoma do pulmão (carcinoma de pequenas células)
L-*myc*	Carcinoma do pulmão
H-*ras*	Carcinoma do cólon, pulmão e pâncreas; melanoma
N-*ras*	Carcinoma das vias urinárias; adenocarcinoma da tireoide; melanoma
src	Carcinoma do cólon (intestino grosso)
trk	Adenocarcinoma da tireoide
gip	Carcinoma do ovário, adenocarcinoma da glândula adrenal

N-*ras*) que codifica a proteína Ras. A proteína Ras normal é uma proteína G (família de proteínas da membrana celular) que é ativada por estímulos extracelulares, sendo desativada facilmente depois de desencadear, no interior da célula, uma resposta à informação recebida. A proteína Ras defeituosa (codificada por gene que sofreu mutação), entretanto, permanece ativada de modo permanente, enviando sinais constantes para a célula se dividir.

De um modo geral, os diferentes oncogenes agem por diversos mecanismos, dos quais os mais estudados serão mencionados a seguir.

- Normalmente, os genes (proto-oncogenes) que codificam fatores de crescimento são controlados muito rigidamente, produzindo esses fatores nos momentos determinados e nas quantidades adequadas para atender às necessidades de multiplicação das células normais. Os oncogenes derivados desses proto-oncogenes codificam fatores de crescimento em grande quantidade e quando eles não são necessários, causando uma proliferação celular indesejável; o oncogene pode codificar o fator de crescimento diretamente ou, então, codificar uma proteína que estimula a expressão do gene para o fator de crescimento
- Alguns oncogenes se expressam por meio da síntese de receptores defeituosos, que emitem sinais constantes para a célula se dividir, mesmo sem receber qualquer estímulo do meio extracelular. Algumas vezes, pode haver uma superprodução dos receptores defeituosos, o que é ainda pior
- Há oncogenes que codificam proteínas que ficam no citoplasma e estimulam a proliferação como se o receptor localizado na superfície da célula tivesse sido ativado. Assim, uma via que normalmente depende de uma molécula externa sinalizadora de proliferação é ativada, mesmo sem receber o sinal
- Em resposta a fatores de crescimento, determinados proto-oncogenes codificam proteínas que atuam como fatores nucleares de transcrição do DNA, promovendo a proliferação das células normais. Os oncogenes desses proto-oncogenes funcionam de modo contínuo, resultando em um estímulo excessivo e constante para a proliferação celular
- Alguns oncogenes codificam proteínas que inibem a apoptose, um mecanismo importante para defesa contra defeitos no DNA; assim, células cujo DNA sofreu mutação, tornando-se cancerosas e que, por isso, deveriam ser eliminadas por apoptose, continuam a proliferar.

Tumores causados por vírus

Tanto vírus com genoma de DNA como vírus com genoma de RNA podem causar tumores benignos e malignos.

Os vírus com genoma de DNA causadores de tumores contêm genes que codificam proteínas com a função de remover o bloqueio para que as células entrem no ciclo mitótico, e proteínas que paralisam o *check-point* principal do ciclo, em que a proliferação celular inapropriada seria bloqueada.

Os vírus com genoma de RNA podem conter oncogenes que são cópias, geralmente defeituosas, de proto-oncogenes existentes nas células e adquiridos por esses vírus em infecções anteriores.

Embora o estudo experimental dos vírus causadores de tumores tenha sido muito importante para a elucidação do papel dos genes na formação dos tumores e dos mecanismos moleculares envolvidos, o número de tumores humanos causados por vírus é muito pequeno. Os mais estudados são os seguintes: vírus da hepatite tipos B e C, SV40 (*simian virus*), vírus do polioma, vírus do papiloma e vírus Epstein-Barr.

Observações finais sobre a complexidade do câncer

São muitos os fatores que dificultam compreender inteiramente a biologia celular do câncer, diagnosticar um tumor o mais cedo possível e erradicá-lo a tempo de salvar a vida do doente. Considerando o significado humano das pesquisas sobre o câncer, algumas dessas dificuldades serão enfatizadas.

Os tumores malignos diferem imensamente uns dos outros, de maneira que, sob a designação de câncer, estão incluídas doenças muito diferentes. Uma grande diferença entre os tumores e que influi muito na malignidade diz respeito à tendência para constituir metástases. Por exemplo, o carcinoma basocelular é um tumor maligno da epiderme que raramente forma metástases, enquanto o melanoma da pele, outro tumor maligno, origina metástases com grande rapidez. Assim, embora localizados na pele e, por isso, podendo ser detectados muito precocemente, esses dois tumores diferem muito na malignidade, sendo o melanoma um dos tumores humanos mais agressivos. A remoção cirúrgica do carcinoma basocelular geralmente leva à cura completa, porém, muitas vezes, quando o melanoma é extirpado pela cirurgia, já formou metástases em outros tecidos, dificultando a cura. Algumas vezes, um melanoma com menos de 1 mm já originou metástases. Assim, o carcinoma basocelular é uma doença de pequena gravidade, enquanto o melanoma é uma doença mais grave.

Também quanto aos sintomas, as variações são muito grandes. Alguns tumores pouco diferenciados podem produzir moléculas, como hormônios, por exemplo, que causam diversos sintomas em outros órgãos ou em todo o organismo. Outras vezes, os sintomas decorrem da localização do câncer. Um tumor, mesmo benigno, do sistema nervoso central pode causar sintomas neurológicos graves, e pode ser de difícil acesso para o cirurgião, tornando difícil o tratamento.

A espécie humana vive em um ambiente muito complexo, onde estão presentes numerosas substâncias cancerígenas, tanto naturais como artificiais, vírus e diversos tipos de radiação. Muitas moléculas ingeridas tornam-se cancerígenas depois de modificadas pelos processos metabólicos de destruição de substâncias tóxicas, que falham nesses casos, produzindo moléculas cancerígenas a partir de precursores que não têm essa propriedade. O sulfato de dimetila, ou DMS (*dimethil sulfate*), é um gás tóxico e cancerígeno que danifica o DNA diretamente, mas o cloreto de vinil, utilizado na fabricação de plásticos, só é mutagênico e cancerígeno depois de modificado no próprio organismo.

As influências das moléculas presentes no ar inspirado, na água, nos alimentos, e as radiações provenientes do ambiente

se exercem sobre pessoas com distintas constituições genéticas e que respondem de maneiras diferentes. Assim, a resposta às influências externas depende muito dos fatores genéticos herdados, como a falta de genes supressores de tumores ou a presença de genes defeituosos que serão encontrados em todas as células somáticas, criando condições facilitadoras para o aparecimento de tumores.

Além dos estudos em cultivos de células, já mencionados, a utilização de camundongos transgênicos tem auxiliado a entender o câncer, mas nem sempre podem ser transpostos diretamente para humanos; por exemplo, camundongos com deleção do gene do retinoblastoma (gene *RB*) têm outros tumores, porém nunca retinoblastoma, como acontece na espécie humana.

Resumo

O termo tumor, a princípio, foi utilizado para designar qualquer edema, independentemente da causa. Porém, atualmente se chama tumor uma proliferação celular desordenada que deveria ser chamada de neoplasia. O tumor que permanece localizado é chamado de benigno, reservando-se a designação de tumor maligno (câncer) para os tumores invasivos, dos quais células se desgarram, são levadas pelo sangue ou pela linfa e vão estabelecer tumores à distância: as metástases.

O câncer, basicamente, é uma doença do DNA. Ele se forma a partir de uma única célula que sofreu mutação, proliferou, e que suas descendentes tenham acumulado mais mutações, até que surjam células que não mais obedecem aos mecanismos de controle do ciclo celular e se multiplicam continuamente. Além de se multiplicarem intensamente, as células cancerosas perdem a capacidade de aderência a outras células e às macromoléculas da matriz extracelular. Como o acúmulo de mutações é, geralmente, um processo lento, o surgimento de células cancerosas é mais comum em pessoas idosas.

Todos os agentes (moléculas, radiação, determinados vírus) que alteram o genoma (DNA) celular são potencialmente cancerígenos (geradores de câncer).

Com frequência, a biologia das células cancerosas é estudada em células transformadas nos cultivos, nos quais adquirem características de malignidade. Enquanto as células normais só se dividem cerca de 50 a 60 vezes nos cultivos, as células transformadas proliferam indefinidamente.

Nos cortes histológicos, as células cancerosas geralmente são mais volumosas, com núcleos também maiores e muito irregulares, ocorrendo muitas mitoses, algumas anormais. Algumas dessas células podem ser aneuploides, isto é, apresentam número de cromossomos que não é um múltiplo do número de cromossomos na célula diploide. Como acontece com todas as células que se multiplicam com frequência, geralmente o citoplasma das células cancerosas é rico em ribossomos e, portanto, basófilo.

O microscópio eletrônico mostrou que as células cancerosas geralmente apresentam o citoesqueleto desorganizado, com uma concentração perinuclear dos microtúbulos e filamentos intermediários, e concentração dos filamentos de actina na periferia do citoplasma, próximo à membrana plasmática.

Os principais segmentos de DNA que participam do surgimento de tumores são os genes supressores de tumores e os oncogenes. Os primeiros codificam proteínas que mantêm as células em G-zero e, portanto, fora do ciclo celular. Um exemplo é o gene RB, que, quando alterado, pode causar o retinoblastoma, um tumor da retina. Os oncogenes são derivados de genes normais denominados proto-oncogenes. A alteração do proto-oncogene faz surgir o oncogene, que leva a célula a perder o controle sobre seu ciclo mitótico, dividindo-se continuamente. Dentre os oncogenes, um dos mais estudados é o oncogene ras, com suas variantes H-*ras*, K *ras* e N-*ras*.

Bibliografia

Bos, J.L. *Ras* oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.*, **49**:4682, 1989.

Cotran, R.S. *et al. Robbins Patologia Estrutural e Funcional.* 4ªed. Editora Guanabara, 1991.

Ellisen, L.W., Haber, D.A. Mechanisms of tumor suppressor genes. *Sci. & Medicine*, (**4**):26, 1998.

Flug, M., Köpf Maier, P. The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat.*, **152**:69, 1995.

Koff, R.S. Hepatitis C. *Sci. & Medicine*, **5** (**4**):16, 1998.

Liotta, L.A. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Amer.*, (Feb):34, 1992.

Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.*, **51**:5054, 1991.

Raw, I. *et al. Bases Moleculares da Medicina. Câncer.* Edusp/Atheneu, 1992.

Rennie, J., Rusting, R. Making headway against cancer. *Sci. Amer.*, (Sept): 28, 1996.

Winkonkal, N.M., Brash, D.E. Squamous cell carcinoma. *Sci. & Medicine*, **5** (**5**):18, 1998.

17 Os Vírus e suas Relações com as Células

Roteiro

- Os vírus são genes móveis que passam de uma célula para outra e modificam o metabolismo celular para reproduzi-los; eles não contêm a maquinaria para sintetizar macromoléculas nem os mecanismos para utilizar energia
- O genoma viral pode ser de RNA ou de DNA
- No laboratório, os vírus são cultivados em embriões de galinha, em culturas de bactérias e em culturas de células animais ou vegetais
- A partícula viral completa, capaz de infectar a célula hospedeira, chama-se vírion e é constituída de pequena variedade de macromoléculas. Imediatamente após sua formação, os vírions deixam a célula onde foram produzidos. Assim, os vírions constituem a forma extracelular dos vírus
- Nos vírions, o genoma é protegido pelo capsídio, constituído por unidades proteicas denominadas capsômeros
- Determinados vírions apresentam um invólucro, por fora do capsídio, formado por uma bicamada de fosfolipídios derivada das membranas celulares e por proteínas codificadas pelo genoma viral
- Os capsídios podem apresentar forma geométrica, com simetria helicoidal ou icosaédrica
- Os poxvírus (vírus da varíola e da vacina) têm morfologia mais complexa e podem atingir o tamanho de 0,3 μm
- Os vírus que parasitam e se multiplicam nas bactérias são chamados bacteriófagos ou, simplesmente, fagos
- Foi mais fácil estudar a multiplicação dos bacteriófagos, e só posteriormente foi elucidada a multiplicação dos vírus animais e vegetais
- Alguns vírus são cancerígenos
- Os viroides são constituídos apenas pelo genoma de RNA, sem capsômeros ou qualquer outra proteção, e sem moléculas facilitadoras da infecção.

Os vírus são genes móveis que se multiplicam utilizando a maquinaria de síntese das células

Os vírus são conjuntos de genes capazes de se transferir de uma célula para outra e de direcionar a atividade das organelas celulares no sentido de reproduzi-los e transferi-los para o exterior, onde vão infectar outras células. Toda célula se origina de outra célula, o que não acontece com os vírus, que são fabricados pela maquinaria celular, seguindo as informações contidas no genoma viral.

A partícula viral completa e extracelular, dotada da capacidade de infectar uma célula hospedeira, chama-se vírion, sendo constituída pelo capsídio formado por capsômeros, que envolve e protege o genoma (RNA ou DNA). Os capsômeros são polímeros de subunidades proteicas, que contêm uma única proteína ou, algumas vezes, uma pequena variedade de proteínas. Alguns vírus apresentam ainda, por fora do nucleocapsídio, um invólucro lipoproteico.

O genoma viral pode ser de DNA ou de RNA, em cadeia simples ou dupla, enquanto nas células o genoma é sempre de DNA em cadeia dupla.

A multiplicação dos vírus geralmente é feita em duas etapas: na primeira, as organelas da célula parasitada fabricam as partes constituintes dos vírions; na segunda, essas partes juntam-se, por um processo de montagem, para formar os novos vírus. Mesmo as células mais rudimentares multiplicam-se por crescimento e divisão da própria célula.

Há vírus animais (Figura 17.1), vegetais e bacteriófagos, assim denominados por parasitarem células animais, vegetais e bacterianas, respectivamente. Os bacteriófagos muitas vezes são chamados, abreviadamente, de fagos. A interação das proteínas virais com as da superfície das células determina a especificidade do vírus, isto é, o tipo de célula hospedeira que o vírus pode penetrar e aí se multiplicar. Geralmente, existe grande especificidade entre o vírus e a célula parasitada. Por exemplo, a maioria dos vírus da gripe humana só consegue parasitar as células epiteliais do aparelho respiratório humano. Outros vírus, como o da raiva, parasitam células de diversos mamíferos, como humanos, cachorros, gatos, morcegos e esquilos.

Figura 17.1 ▪ Micrografia eletrônica de célula humana tumoral (câncer), contendo partículas virais dentro das cisternas do retículo endoplasmático.

O cultivo de vírus só pode ser feito em células

O cultivo dos vírus é dificultado pelo fato de que eles só se multiplicam no interior das células. A inoculação em animais ou plantas foi a primeira técnica utilizada para o estudo experimental dos vírus, porém apresenta inconvenientes óbvios. Atualmente, os vírus são cultivados principalmente em culturas de bactérias, culturas de células e em embriões de galinha.

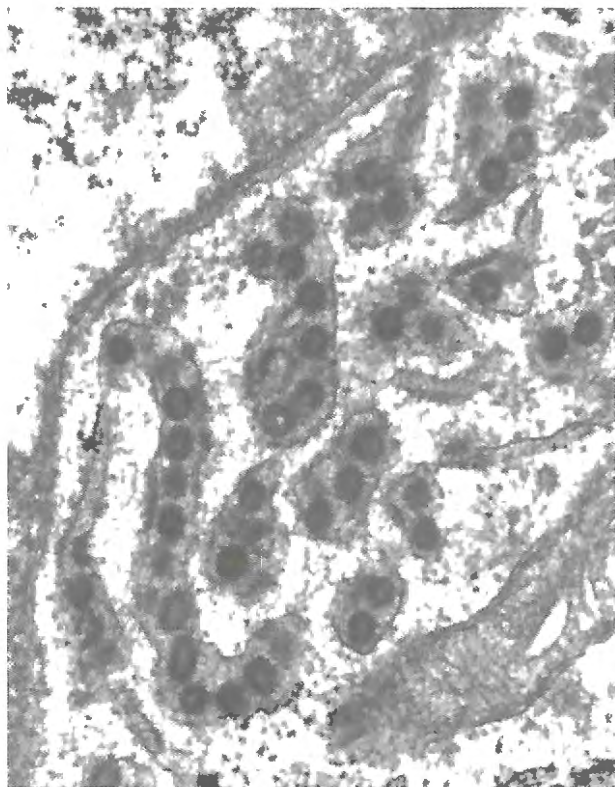
Em geral, a proliferação dos vírus nos cultivos de células é acompanhada por meio das alterações que os vírus causam nas células e que podem ser detectadas com facilidade ao microscópio óptico, alterações essas chamadas efeito citopático. As células cultivadas são muito mais sensíveis aos vírus do que enquanto fazem parte do corpo de um animal; por exemplo, o vírus da poliomielite, quando infecta o homem, não ataca os rins, mas se multiplica muito bem em cultura de células renais de primatas.

Os vírus vegetais podem ser estudados por meio da inoculação em plantas. Todavia, essa técnica não se presta a estudos quantitativos mais precisos, e a virologia vegetal ressentia-se da falta de um sistema de cultivo de tecido como aquele de que dispõe a virologia animal, em que milhões de células cultivadas podem ser infectadas ao mesmo tempo e os eventos subsequentes podem ser seguidos com facilidade. Mais recentemente, têm sido utilizados protoplastos de células foliares, obtidos pela digestão da parede celular com pectinase e celulase. As células vegetais sem paredes, e em suspensão, podem ser então infectadas pela simples adição de uma suspensão de vírus ao meio de cultura.

O cultivo de vírus em embriões de galinha é uma técnica econômica, e a inoculação, conforme o vírus que se deseja cultivar, pode ser feita na membrana corioalantoide ou em outros anexos embrionários.

Os vírus são constituídos por pequena variedade de moléculas

Os vírus são constituídos basicamente por proteínas e ácidos nucleicos, e alguns contêm pequenas quantidades de outros compostos, como os lipídios encontrados no envelope de determinados vírus.

A variedade de moléculas proteicas presentes é sempre muito restrita, e alguns vírus contêm apenas um tipo de proteína. Contudo, as proteínas são moléculas antigênicas, isto é, capazes de estimular as defesas do organismo invadido

e a formação de anticorpos; por isso, são importantes para a fabricação das vacinas usadas na imunização do homem e dos animais.

Na maioria dos vírus com genoma de DNA, este se apresenta como uma hélice dupla; porém, o genoma de RNA pode ser um filamento simples. DNA em filamento simples e RNA em filamento duplo são menos frequentes.

Além do ácido nucleico do genoma e das proteínas dos capsômeros, alguns vírus saem da célula hospedeira com um invólucro derivado do sistema celular de membranas. Como as membranas celulares, o invólucro viral é uma bicamada lipídica com proteínas inseridas, que forma um mosaico fluido. Os lipídios são os mesmos das membranas celulares, mas as proteínas, todas codificadas pelo genoma do vírus, são principalmente glicoproteínas que irão fixar os vírions a proteínas específicas da membrana da próxima célula hospedeira, possibilitando a propagação da infecção viral.

Os mixovírus e os paramixovírus (*mixo*, muco) contêm neuraminidase, enzima que ataca as glicoproteínas e proteoglicanas do glicocálice e da secreção mucosa que cobre a superfície do epitélio das vias respiratórias e do tubo digestivo, facilitando a penetração desses vírus nas células hospedeiras.

Determinados vírus com genoma de RNA, como, por exemplo, os mixovírus e o vírus da estomatite vesicular, contêm uma polimerase que copia RNA, formando outra molécula de RNA, que é complementar da primeira. Nesses casos, a RNA-polimerase dependente de RNA, transportada pelo vírus, é essencial para iniciar a replicação do genoma viral, pois, nas células, o fluxo de informação é sempre no sentido de DNA para RNA, não existindo nas células enzima para a cópia de RNA a partir de outra molécula de RNA. Nas células, as RNA-polimerases são DNA-dependentes.

Os fagos contêm lisozima, que rompe as ligações entre o ácido N-acetilmurânico e a N-acetilglicosamina, existentes na parede das bactérias, facilitando a infecção pelo fago.

Nos vírus cujo RNA é uma hélice dupla, após a penetração na célula, os filamentos se separam, e um deles liga-se aos ribossomos, atuando como mensageiro para a síntese da enzima RNA-polimerase RNA-dependente, não existente nas células.

Nos vírus com genoma constituído por filamentos simples de RNA, geralmente esse filamento serve de mensageiro para a síntese da RNA-polimerase dependente de RNA. Como o RNA mensageiro é considerado um filamento positivo, o RNA desses vírus é tido também como RNA-positivo. Depois de catalisar a síntese de RNA-polimerase, o genoma viral é copiado em filamentos negativos que servirão como modelo (*template*) para a formação dos filamentos positivos que serão incorporados aos novos vírus, constituindo os novos genomas (Figura 17.9).

Entretanto, em outros casos, o filamento simples do genoma viral não atua como RNA mensageiro, não sendo capaz de promover a síntese da RNA-polimerase dependente de RNA. Nesses casos, diz-se que o RNA desses vírus é negativo. Sua multiplicação só é possível porque os vírus com genoma de RNA-negativo contêm RNA-polimerase dependente de RNA, a eles incorporada no ciclo de multiplicação anterior. Portanto, quando esses vírus deixam a célula infectada, levam a RNA-polimerase necessária para iniciar sua multiplicação ao penetrarem nas células que irão parasitar em seguida. A RNA-polimerase dependente de RNA trazida pelos próprios vírus catalisa a formação dos filamentos de RNA positivo, que irão codificar mais RNA-polimerase, e irão catalisar também a formação de filamentos de RNA-negativo para o genoma dos novos vírus.

Em muitos vírus, os capsômeros formam uma hélice ou um icosaedro | Alguns vírus apresentam invólucro

A morfologia externa e a estrutura interna dos vírions são estudadas principalmente pelas técnicas de difração de raios X e de microscopia eletrônica de preparados sombreados, ou "corados" negativamente (Capítulo 2). Os vírions com simetria podem exibir simetria helicoidal (Figura 17.2) ou simetria icosaédrica (Figuras 17.3 e 17.4).

Vírions helicoidais

Dentre os vírus cujas partículas infectantes apresentam simetria helicoidal, o mais bem estudado é o do mosaico do tabaco, que, por ter sido o primeiro vírus cristalizado, foi também o primeiro a ser analisado por difração de raios X.

Esse vírion tem a forma de um cilindro com 300 nm de comprimento por 18 nm de diâmetro, contendo 2.130 capsô-

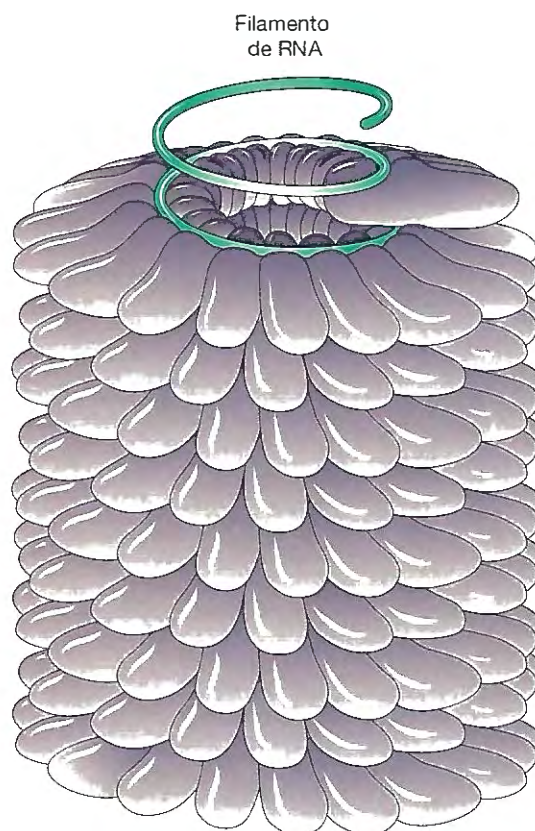



Figura 17.2 ▪ Organização estrutural do vírion do mosaico do tabaco. Simetria helicoidal. Esse vírion contém 2.130 subunidades proteicas organizadas como uma hélice, seguindo a hélice de RNA internamente localizada e que constitui o genoma.

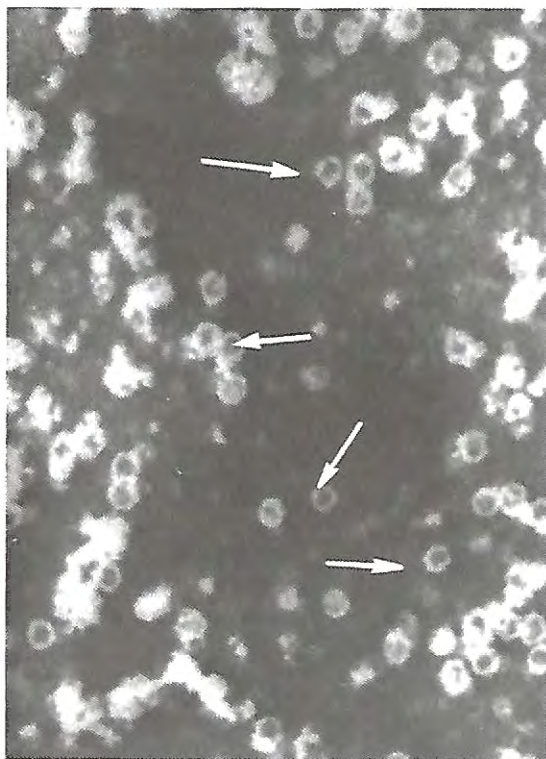



Figura 17.3 ▪ Eletromicrografia do vírion da poliomielite. O espaço vazio, central (em cada vírion era ocupado pelo ácido nucleico [RNA]) que foi removido. Coloração negativa com ácido fosfotúngstico. Aumento: 90.000×. (Cortesia do Dr. Dalton Ramalho Weigl.)

meros organizados como uma hélice em torno de um orifício central de 4 nm de diâmetro. Cada capsômero é uma molécula proteica com 158 aminoácidos.

O genoma é um filamento único de RNA, disposto em hélice ao longo do orifício central, unindo-se por ligações covalentes aos capsômeros (Figura 17.2). A molécula de RNA contém 6.400 nucleotídios, e cada três nucleotídios se combinam com um capsômero.

A combinação do RNA com as moléculas proteicas, além de determinar o tamanho dos vírions, aumenta muito a sua estabilidade. A agregação de capsômeros na ausência de RNA forma partículas de formato semelhante ao do vírion normal, porém pouco estáveis e de comprimento variável.

▪ *Vírions icosaédricos*

Esses vírions têm a forma de um icosaedro, que é uma figura geométrica com 20 faces triangulares e 12 vértices. Nos diferentes vírions de simetria icosaédrica, variam o número e o tamanho dos capsômeros, porém todos têm 20 faces de forma triangular e 12 vértices.

O tamanho dos vírions icosaédricos também é determinado pelo tamanho da molécula de ácido nucleico. Vírus com genoma pequeno apresentam-se como vírions também pequenos.

O adenovírus é um exemplo de vírus cujas partículas têm simetria icosaédrica. Esse vírus foi descoberto em material

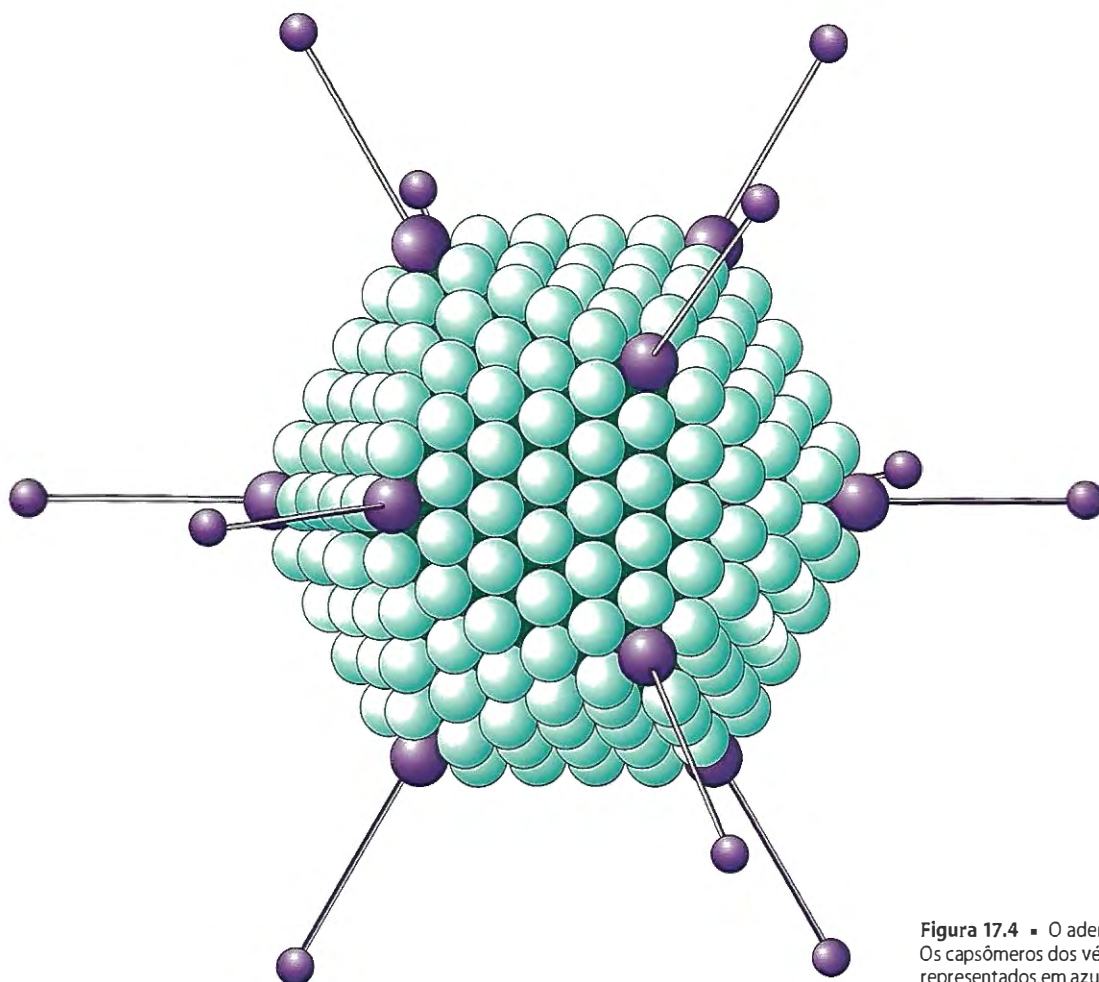



Figura 17.4 ▪ O adenovírus tem simetria icosaédrica. Os capsômeros dos vértices, com seus filamentos, estão representados em azul.

obtido de adenoides humanas (chama-se adenoides a hipertrofia da tonsila faríngea em consequência de inflamação crônica), razão pela qual recebeu o nome de adenovírus. Seus vírions têm 89 nm de diâmetro e são formados por 252 capsômeros. Os 12 capsômeros dos vértices apresentam longos filamentos (Figura 17.4).

▪ *Vírions com invólucro*

Todos os vírus animais com nucleocapsídios helicoidais e alguns icosaédricos apresentam um invólucro que envolve e protege o nucleocapsídio. Os vírus cujos nucleocapsídios não apresentam simetria bem definida também podem ser envolvidos por invólucro. Os invólucros virais são constituídos por uma bicamada lipídica (principalmente fosfolipídios), derivada da membrana das células hospedeiras, e por proteínas codificadas pelo ácido nucleico viral.

Os mixovírus, incluindo o vírus da gripe, têm nucleocapsídio helicoidal, com invólucro. O nucleocapsídio tem 9 nm de diâmetro, e cada subunidade proteica tem 3 nm. Em volta do nucleocapsídio, encontra-se o invólucro lipoproteico, com 6 a 10 nm de espessura. A superfície do invólucro contém filamentos radiais com 10 nm de comprimento por 1 nm de espessura.

Como exemplo de vírion icosaédrico com invólucro, será descrito o vírion causador do herpes. Seu nucleocapsídio contém 162 capsômeros e é recoberto por um invólucro lipoproteico com 4 a 10 nm. Como no caso do vírion da gripe, neste também se encontram prolongamentos em direção radial que conferem ao vírion o aspecto de uma esfera com espinhos.

▪ *Vírions mais complexos*

O grupo dos poxvírus inclui o agente causador da varíola humana e o vírus utilizado para vacinação contra varíola, chamado de vírus da vacina. Seus vírions têm morfologia complexa; não exibem simetria helicoidal nem icosaédrica. Por suas grandes dimensões, podendo atingir 0,3 mm, esses vírions são visíveis ao microscópio óptico.

Dentre os poxvírus, o vírion da vacina é o mais estudado, pois é de fácil cultivo e sua patogenicidade para o homem em geral se restringe a uma pústula no ponto de inoculação. Sua morfologia é exatamente igual à do vírion da varíola.

O vírion da vacina tem forma retangular com as bordas curvas, medindo 250 a 320 nm de comprimento. Esses vírions têm sido estudados ao microscópio eletrônico em cortes finos e em preparados com "coloração" negativa.

O vírion da vacina tem um nucleoide central, de forma bicôncava, que contém o DNA do vírus. Em cada lado do nucleoide, encontra-se uma estrutura ovoide, denominada corpo lateral, cuja função é desconhecida. Envolvendo o nucleoide e os corpos laterais, existe um invólucro que, ao contrário do que ocorre com os outros invólucros virais, não é derivado da membrana da célula hospedeira.

Na superfície do vírion, sobre o invólucro, estão situados filamentos proteicos ocos que se entrelaçam, conferindo um aspecto granular ao vírion quando este é examinado ao microscópio eletrônico com "coloração" negativa.

A Tabela 17.1 mostra a classificação dos vírus de acordo com a morfologia, o genoma e algumas propriedades químicas.

▪ O estudo da proliferação dos bacteriófagos abriu caminho para o esclarecimento da multiplicação dos vírus animais e vegetais

O sistema constituído por um bacteriófago (Figura 17.5) e sua bactéria hospedeira é muito favorável para o estudo da multiplicação dos vírus. Como exemplo, será descrita a multiplicação do fago T_4 da *Escherichia coli*, que, como os vírus em geral, pode multiplicar-se por multiplicação lítica ou por multiplicação lisogênica.

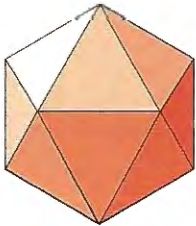
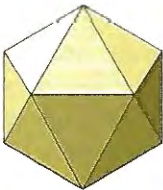
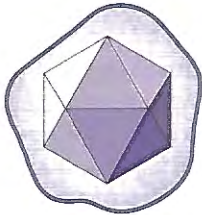
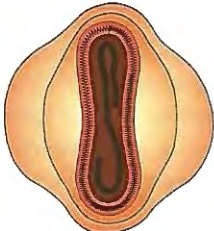
▪ *Multiplicação lítica*

Na multiplicação lítica, todas as bactérias infectadas se rompem e morrem, isto é, são lisadas pela atividade dos vírus. Na multiplicação lítica, distinguem-se as fases de adsorção, penetração, eclipse e liberação.

O processo de infecção da bactéria tem início pela fase de adsorção, durante a qual o fago desenrola as fibras da cauda e se fixa à parede da *E. coli*, ligando-se a moléculas específicas da parede bacteriana.

Conforme a bactéria, os receptores do fago podem ser lipoproteínas ou lipopolissacarídios. É necessário que exista uma complementaridade estereoquímica entre moléculas do fago e receptores da bactéria, e isso determina a especificidade entre o fago e a bactéria.

A penetração consiste na injeção do DNA do fago no interior da bactéria (Figura 17.5). A cabeça, a cauda e a bainha do bacteriófago não penetram, permanecendo presas à parede bacteriana.

As fibras da cauda se fixam sobre a parede bacteriana e, em seguida, a bainha se contrai, introduzindo a cauda do bacteriófago na espessura da parede bacteriana. Essa contração libera uma enzima que ataca a parede da bactéria sem destruir os receptores do fago. Simultaneamente, o bacteriófago injeta seu DNA no interior da bactéria (Figura 17.6).

Após a penetração do DNA, segue-se a fase de eclipse, em que não existem bacteriófagos com capacidade infectante. Nessa fase, há síntese do DNA do bacteriófago, o que pode ser demonstrado pelo exame bioquímico de amostras retiradas do cultivo. Acontece que o DNA dos bacteriófagos T-pares contém certa porcentagem da base hidroximetilcitosina, que não existe no DNA da bactéria. Pela dosagem de hidroximetilcitosina, pode-se avaliar a síntese do DNA do fago.

Na fase de eclipse, os bacteriófagos consistem basicamente em seu DNA e não são infectantes por não apresentarem o aparelho de inoculação. Diz-se que os vírus, nesse estágio, estão sob a forma vegetativa.

Dentro dos primeiros cinco minutos após a infecção aparecem as proteínas precoces, que são sintetizadas sob a direção do DNA do bacteriófago, mas não serão incorporadas aos novos bacteriófagos. As proteínas precoces participam da síntese de macromoléculas do fago. As moléculas das proteínas

Tabela 17.1 ▪ Principais grupos de vírus.

Grupo e ácido nucleico	Morfologia	Simetria do capsídeo	Tamanho do vírion (nm)	Peso molecular do ácido nucleico	Número de genes
Picornavírus RNA		I	20 a 30	2×10^6*	10
Arbovírus RNA		I	40 a 50	2×10^6	10
Reovírus RNA		I	70 a 75	10×10^6	50
Mixovírus RNA		H	80 a 200	2×10^6	10
Rabdovírus RNA		H	60 a 250	2×10^6	10
Papovavírus DNA		H	40 a 55	2 a 5×10^6	10
Adenovírus DNA		I	60 a 85	23×10^6	50
Herpes-vírus DNA		I	180 a 250 (pode ocorrer sem invólucro, medindo 110 nm)	Estimado em 40 a 84 $\times 10^6$	150
Poxvírus DNA		Desconhecida	Largura = 230, Comprimento = 300	Estimado em 160 a 240 $\times 10^6$	400

*Exceto o RNA de rinovírus, que apresenta peso molecular de 4×10^6.
I = icosaédrica; H = helicoidal.

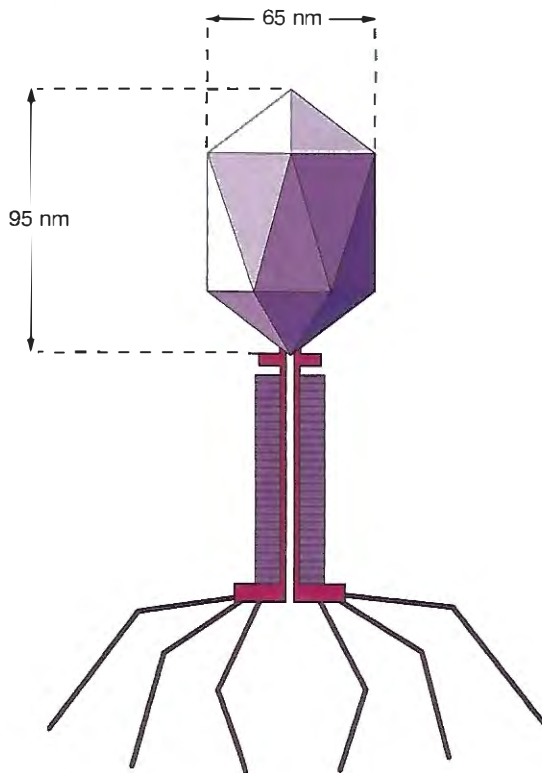



Figura 17.5 ▪ Esquema de um bacteriófago T-par.

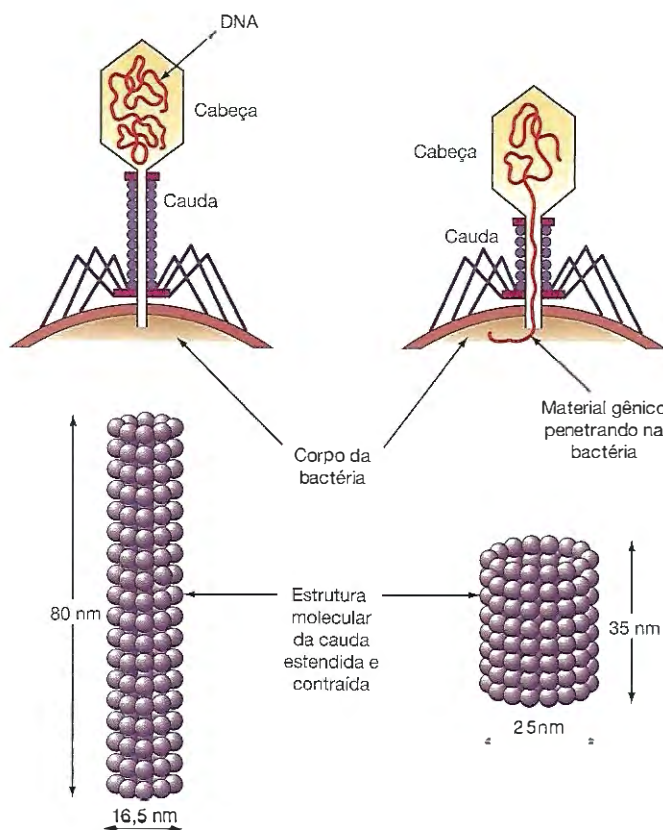



Figura 17.6 ▪ Desenhos esquemáticos mostrando a injeção do genoma de DNA do bacteriófago na bactéria. *À esquerda*, observa-se que a cauda do bacteriófago está distendida e, *à direita*, a cauda está contraída. Note que a cauda se contrai porque diminui de extensão e aumenta de diâmetro graças ao deslizamento de proteínas globulares entre si.

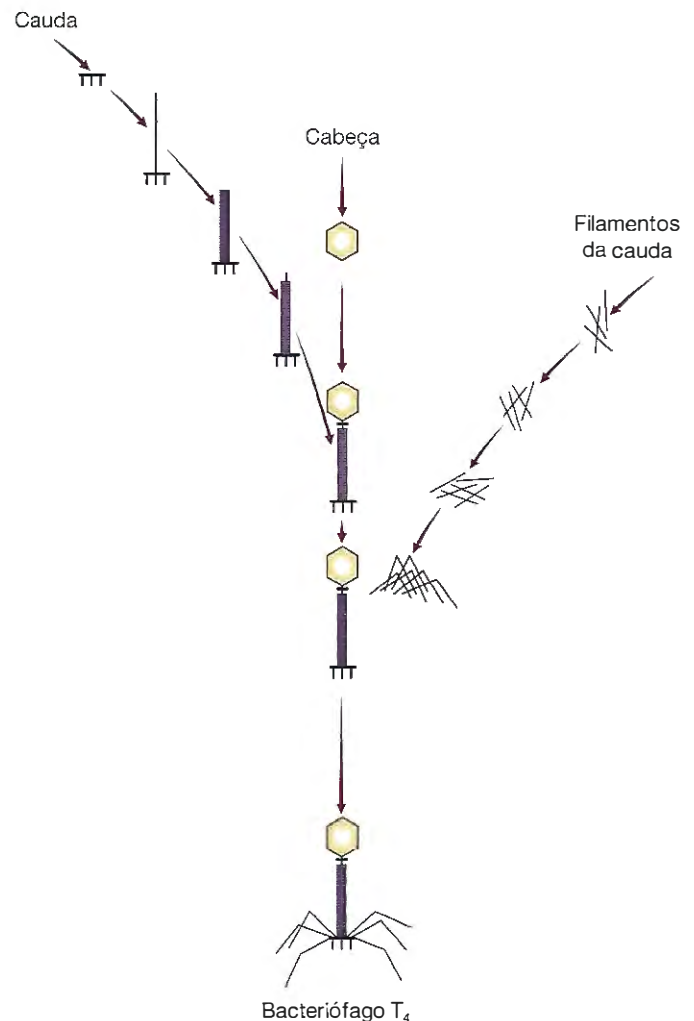



Figura 17.7 ▪ Montagem dos bacteriófagos T-par.

estruturais, isto é, as que construirão os vírions, começam a aparecer 10 min após a infecção, e seu número aumenta progressivamente.

A montagem dos vírus, após a síntese do DNA e das proteínas estruturais, é espontânea, sem dispêndio de energia. No caso dos bacteriófagos T_4, a organização de novos fagos é decorrente da atividade de três linhas de montagem: uma forma as cabeças contendo o DNA envolvido pelos capsômeros; outra forma as caudas; e a terceira forma as fibras das caudas. Por fim, as três partes – cabeça, cauda e fibras da cauda – reúnem-se para constituir os bacteriófagos, corr o mostra a Figura 17.7. Após a montagem dos fagos, a célula bacteriana se rompe, lançando-os no meio externo. A lisozima, enzima codificada pelo fago, facilita a ruptura da parede bacteriana.

▪ Multiplicação lisogênica

Na multiplicação lisogênica, que não acarreta a destruição da célula hospedeira, o DNA do vírus liga-se ao cromossomo bacteriano e se multiplica juntamente com ele (Figura 17.8). O vírus que está incorporado ao cromossomo celular é um provírus. No exemplo mencionado, trata-se de um profago. A bactéria que contém o profago é denominada bactéria lisogênica porque algumas delas, após sintetizarem vírions, como no ciclo lítico de replicação, se rompem e liberam bacteriófagos infectantes.

Determinados agentes físicos ou químicos, que atuam sobre os ácidos nucleicos e são cancerígenos, como os raios X e a mostarda nitrogenada, induzem os profagos a se tornarem virulentos, causando assim a lise das bactérias. A transformação do profago em fago infectante chama-se indução (Figura 17.8).

Na multiplicação lisogênica, os bacteriófagos podem levar DNA do genoma de uma bactéria para outra, tendo certamente influído na evolução das bactérias.

> Muitas vezes, o profago confere à bactéria um novo traço fenotípico. Um exemplo é a bactéria *Corynebacterium diphtheriae*, que só produz toxina diftérica quando contém um profago.

A multiplicação dos fagos de RNA, como de qualquer outro vírus com genoma de RNA, é mais complexa, e está explicada na Figura 17.9.

Figura 17.8 ▪ Multiplicação lisogênica de um bacteriófago. O DNA do bacteriófago é sintetizado juntamente com o DNA da bactéria. As bactérias-filhas contêm o profago. Por indução, o profago torna-se virulento e causa a lise da bactéria (multiplicação lítica).

Os raros movimentos dos vírus são decorrentes da modificação na estrutura quaternária das proteínas

Esse mecanismo foi observado em determinados bacteriófagos nos quais ocorre o encurtamento da cauda durante a injeção do material gênico na bactéria parasitada. Esse tipo de vírus é constituído essencialmente por uma cabeça, contendo um filamento de DNA, e pela cauda (Figura 17.6). Verificou-se que, quando da introdução do material gênico presente na sua cabeça para dentro da bactéria, a cauda do bacteriófago sofre um pro-

Figura 17.9 ▪ Diversas fases da multiplicação de um bacteriófago cujo genoma é um filamento único de RNA.

cesso de alargamento, tornando-se ao mesmo tempo mais curta. Essa cauda é uma macromolécula proteica cuja estrutura quaternária é constituída por moléculas proteicas globosas (monômeros) que se associam em espiral, formando um tubo comprido e estreito de 80 × 16,5 nm. Durante a injeção do material gênico nas bactérias, ocorre o deslizamento dos monômeros proteicos e a cauda se encurta e alarga, ficando com 35 × 25 nm (Figura 17.6).

Os vírus animais se multiplicam basicamente da mesma maneira que os bacteriófagos

Os estudos sobre a replicação dos vírus animais são realizados em cultivos de células, geralmente linhagens celulares transformadas, que se multiplicam indefinidamente nos cultivos. A utilização de células cultivadas e inoculadas com um número elevado de vírions possibilita o estudo de uma replicação sincronizada, em que todas as células do cultivo exibem as mesmas moléculas virais, podendo fornecer essas moléculas em grandes quantidades. Os vírus animais se multiplicam em células eucariontes, que são estruturalmente muito mais complexas do que as células bacterianas, de modo que a proliferação deles difere da dos fagos em alguns aspectos. Por outro lado, cada grupo estrutural de vírus tem suas particularidades de multiplicação, em razão de características como o tipo de molécula do genoma e a presença de invólucro.

Penetração dos vírus na célula e exposição do genoma | Fases de adsorção e de eclipse

Os vírions que atacam as células animais não apresentam estruturas especializadas para a fixação, como acontece com o bacteriófago T_4, mas têm na superfície moléculas específicas para a adsorção, com grande afinidade para constituintes normais da membrana celular, frequentemente glicoconjugados (glicolipídios, glicoproteínas e proteoglicanas). Com muita frequência, os vírions que se fixam sobre as células penetram em vesículas de pinocitose, constituídas por membrana derivada da membrana celular.

Nos vírus envoltos por um invólucro, o processo pode ser diferente, ocorrendo a fusão direta do invólucro do vírus com a membrana plasmática, sem a formação de vesículas de pinocitose. É o que acontece com os paramixovírus, cujo invólucro contém glicoproteínas fusogênicas que promovem a fusão do invólucro viral com a membrana plasmática e a penetração direta do nucleocapsídio no citosol.

Outras vezes, os vírus com invólucro penetram por pinocitose e passam para o interior de endossomos, posteriormente fundindo suas membranas com a membrana do endossomo e liberando os nucleocapsídios para o citosol. A fusão do invólucro viral com a membrana do endossomo é decorrente de uma modificação na forma da molécula de glicoproteínas virais, provocada pelo baixo pH existente no interior dos endossomos. Na sua conformação modificada, essas glicoproteínas se tornam fusogênicas. Assim, os nucleocapsídios passam dos endossomos para o citossol antes de penetrarem nos lisossomos, nos quais os vírus poderiam ser destruídos pelo pH muito baixo e pelas enzimas contidas nos lisossomos.

No citosol, o ácido nucleico do vírus é liberado do nucleocapsídio para que a replicação possa ser iniciada. No entanto, muitos vírus com invólucro e que contêm DNA-polimerase ou RNA-polimerase como um componente de seus nucleocapsídios podem iniciar a replicação do ácido nucleico assim que o nucleocapsídio é liberado no citosol. Os vírus que não contêm polimerase, entretanto, só podem iniciar a replicação após a desmontagem dos nucleocapsídios e a codificação da polimerase pelo genoma viral.

O mecanismo de desmontagem dos vírions no citoplasma celular, pela dissociação dos capsídios, é um processo ainda não completamente esclarecido.

O intervalo de tempo entre a remoção dos invólucros e dos capsídios, com liberação do genoma do vírus, constitui a fase de eclipse já mencionada no caso da multiplicação dos fagos.

Síntese das proteínas e do ácido nucleico viral

Todas as moléculas virais são codificadas pelas informações trazidas pelos vírus, e a produção de suas proteínas depende de RNA mensageiros típicos do vírus, que se associam a ribossomos das células parasitadas. O RNA de determinados vírus tem dupla função, atua como modelo (*template*) para a replicação do próprio RNA e também como RNA mensageiro. Outros vírus de RNA, e todos com genoma de DNA, primeiro produzem RNA mensageiro pela transcrição de seus genomas com o auxílio de uma RNA-polimerase da célula hospedeira.

As proteínas virais podem ser divididas em dois grupos: as proteínas estruturais, que farão parte dos capsídios, e as proteínas não estruturais, muitas das quais atuam no processo de replicação do ácido nucleico viral.

A replicação da maioria dos vírus com genoma de RNA apresenta a peculiaridade de ocorrer no citoplasma, sob um molde (*template*) de RNA, uma síntese catalisada por RNA-polimerase dependente de RNA que é codificada pelo próprio vírus, pois as células não contêm essa enzima. Assim, a replicação desses vírus prossegue mesmo que seja inibida a atividade da RNA-polimerase dependente de DNA, enzima existente no núcleo das células. Enquanto normalmente a síntese intracelular de RNA tem lugar no núcleo da célula, a síntese do RNA desses vírus, ao contrário, se realiza no citoplasma.

Todavia, há vírus, denominados retrovírus, com genoma de RNA em filamento simples, que primeiro transcrevem seu genoma em moléculas de DNA de filamento duplo, que se integram aos cromossomos e codificam as proteínas próprias do vírus. Essa transcrição é feita com a participação da enzima transcriptase reversa, que possibilita a síntese de DNA, copiando um molde de RNA. A transcriptase reversa é codificada pelo genoma do vírus, pois, na célula, não existe transcriptase de DNA dependente de RNA. Quando incorporado ao cromossomo da célula, o retrovírus constitui um provírus.

A replicação dos vírus com genoma de DNA é mais complexa e envolve a participação de enzimas celulares e enzimas codificadas pelo genoma dos vírus, dentre as quais uma DNA-polimerase. Todos os vírus com genoma de DNA se replicam no núcleo celular, e a única exceção conhecida são os poxvírus, que se multiplicam inteiramente no citoplasma da célula hospedeira.

Embora a complexa estrutura das células eucariontes animais seja mobilizada para sintetizar vírus, o microscópio eletrônico não mostra grandes modificações celulares nas fases iniciais da infecção viral. Algumas vezes aparecem, no citoplasma, zonas mais densas aos elétrons, que devem ser locais de produção das moléculas dos vírus. Todavia, logo que exista um número elevado de moléculas de ácido nucleico e de proteínas dos vírus, começa a montagem dos vírions, um processo que pode ser seguido ao microscópio eletrônico.

Montagem de vírus icosaédricos

Da mesma maneira que os vírus em geral, os icosaédricos se formam por montagem de subunidades proteicas que irão constituir o capsídio em torno do ácido nucleico viral. A maioria dos vírus com genoma de DNA sintetiza seu genoma no interior do núcleo celular, no qual ocorre também a montagem dos vírions. Ao contrário, a replicação do genoma dos vírus icosaédricos de RNA tem lugar no citoplasma, sendo os vírions montados no citosol.

Montagem de vírus com invólucro

A montagem desses vírus tem a particularidade de ocorrer como um brotamento de uma membrana celular, em que foram inseridas glicoproteínas virais e das quais foram excluídas as proteínas celulares. Assim, o invólucro do vírus é constituído por uma bicamada lipídica derivada do sistema celular de membranas, porém as proteínas aí contidas são próprias do vírus, tendo sido codificadas por mRNA virais associados a ribossomos celulares.

Determinados vírus com invólucro são montados nas proximidades da membrana plasmática, e os vírions são liberados diretamente para o meio extracelular, brotando da membrana plasmática. Muitos vírus com invólucro, contudo, brotam de outras membranas da célula. Nesses casos, o brotamento ocorre primeiro e, depois, tem lugar a liberação para o meio extracelular. Alguns vírus brotam para o interior das cisternas do aparelho de Golgi; outros brotam para o das cisternas do retículo endoplasmático, seguindo depois para a superfície celular, pela via secretora, sendo os vírions liberados por exocitose.

Os herpes-vírus constituem uma família de vírus icosaédricos com genoma de DNA, cujos nucleocapsídios são montados no núcleo celular. Esses vírus brotam para a cisterna perinuclear, envoltos pela membrana interna do envoltório nuclear. Como a cisterna perinuclear é uma dependência do retículo endoplasmático, os vírions completos seguem a via secretória, para atingirem o meio extracelular, seguindo o mesmo caminho das proteínas secretadas pela célula.

O herpes-vírus deixa a célula hospedeira intacta, mas pode infectar células adjacentes sem passar pelo meio extracelular. Esse vírus promove a fusão das membranas plasmáticas, formando-se células gigantes multinucleadas. Posteriormente, essas células reconstituem suas membranas e se separam, voltando à forma inicial. Isso explica por que o herpes é uma doença que se prolonga, com períodos de melhora e de recaída, apesar do elevado teor de anticorpos no sangue dos doentes. Passando diretamente de uma célula para outra, os vírions não entram em contato com os anticorpos presentes nos fluidos extracelulares.

O caso especial dos poxvírus

A síntese e a estruturação dos poxvírus apresentam características próprias e que não são compartilhadas por outros tipos de vírus. Por exemplo, embora o genoma desses vírus seja de DNA, a replicação tem lugar no citoplasma, e não no núcleo celular, como acontece com os outros vírus de DNA, e o invólucro dos poxvírus não provém do sistema de membranas da célula, sendo uma membrana fabricada pelo próprio vírus.

Dentre os vírus animais, os poxvírus são os de maior tamanho e também os mais complexos, sendo formados por diversas estruturas evidenciáveis ao microscópio eletrônico e constituídas por diversos tipos de moléculas. Eles codificam muitas enzimas que participam da síntese do DNA viral, o que é importante para a replicação citoplasmática do seu genoma.

Os vírus causam diversas doenças no homem e nos animais

Os vírus causam diversas doenças no homem e nos animais, com maior ou menor gravidade, desde o resfriado comum e a gripe até doenças graves como a raiva, a AIDS (*acquired immuno deficiency syndrome*), a varíola e a poliomielite. A vacinação intensa e sistemática erradicou a varíola e reduziu consideravelmente os casos de poliomielite e raiva, mas ainda não existe vacina contra o vírus causador da AIDS, síndrome que constitui um sério problema médico e social. Determinados vírus, ao lado de outros fatores, participam do surgimento de alguns tipos de câncer (Capítulo 16). O vírus HIV (Figura 17.10), agente etiológico da AIDS, tem sido muito estudado e sua biologia é bem conhecida. Isso foi possível porque o aparecimento dessa síndrome coincidiu com o desenvolvimento da tecnologia moderna de DNA recombinante. HIV-1 é um retrovírus cujo genoma, como o de todos os retrovírus, é constituído de um filamento simples de RNA. O genoma do vírus da AIDS é pequeno, contendo apenas genes para codificar a transcriptase reversa, enzima que ele leva quando deixa uma célula hospedeira, e as proteínas estruturais do capsômero e do envelope viral. Já se conhece a sequência completa de nucleotídios nesse genoma, que apresenta variações responsáveis pelos diversos tipos de HIV existentes.

O HIV (Figura 17.10) se prende às células que têm a molécula superficial CD4, uma proteína encontrada preferencialmente nos linfócitos T *helper*. Esses linfócitos têm papel importante na defesa imunitária do organismo, ativando outras células do sistema imunitário, principal defesa do organismo contra microrganismos invasores.

Ao penetrar nas células, o genoma viral se apropria das organelas, passando a dirigir o metabolismo celular para sintetizar HIV-1. Para isso, o vírus se utiliza da enzima transcriptase reversa, a qual fabrica um filamento duplo de DNA, que é cópia do RNA do vírus. O filamento duplo de DNA que foi copiado do genoma viral pode entrar no núcleo e se integrar no genoma celular. Assim, a infecção pode entrar em um período latente, permanecendo o DNA viral nos cromossomos do núcleo celular como um provírus, sem que se produzam partículas virais. Após um período de tempo variável, a infecção pode ser reativada, com a produção do RNA do genoma do HIV-1 e de RNA mensageiro para as proteínas características dos vírions.

Quando estão completas no citosol, as partículas virais, ou vírions, brotam da superfície celular, envolvidas por pedaços da membrana da célula, constituídos por lipídios celulares e proteínas do vírus. As células parasitadas permanecem vivas e tornam-se verdadeiras fábricas de novos vírus, prolongando e agravando a infecção. As proteínas virais localizadas no invólucro são antígenos responsáveis pelo surgimento de anticorpos no sangue dos doentes de AIDS. Os anticorpos são proteínas de defesa que, muitas vezes, destroem microrganismos ou neutralizam moléculas prejudiciais ao organismo. No caso da AIDS, esses anticorpos não têm conseguido deter o avanço da síndrome,

mas está se tentando produzir uma vacina que neutralize as proteínas do invólucro do HIV, impedindo que o vírus se prenda ao receptor CD4.

Alguns vírus, como os exemplos que serão mencionados a seguir, contribuem para o surgimento de determinados tipos de câncer, mas, na grande maioria dos casos de câncer, não se verifica a participação viral. O problema do câncer, contudo, é muito complexo e, para melhor esclarecimento, deve ser consultado o Capítulo 16.

O vírus da hepatite tipo B é um vírus com pequeno genoma de DNA, que parasita células do fígado de diversos animais, além de humanos. Há inicialmente uma hepatite aguda que, em 5 a 10% dos casos, origina uma infecção crônica, com permanência dos vírus nas células hepáticas, o que aumenta cerca de 100 vezes a possibilidade de aparecer um tumor maligno das células do fígado (hepatoma ou carcinoma hepatocelular). O mecanismo pelo qual o vírus da hepatite B causa o hepatoma não está ainda bem esclarecido.

O vírus da hepatite tipo C tem o genoma de RNA com 9,4 kb (quilobases) de tamanho. Na espécie humana, causa uma hepatite aguda e pode permanecer no fígado por muito tempo, aumentando a incidência de câncer hepático (hepatoma ou carcinoma hepatocelular). Estatísticas norte-americanas indicam que apenas 15% dos casos de hepatite aguda são devidos ao vírus do tipo C, mas calcula-se que 4 milhões de pessoas estão com a forma persistente de infecção, com o risco de virem a sofrer de câncer do fígado.

Os vírus do papiloma têm pequeno genoma de DNA, constituído por cerca de 8 kb (quilobases = 1.000 pares de bases), que induzem tumores benignos e malignos em humanos e em outras espécies. Há mais de 60 tipos de vírus do papiloma que causam desde verrugas (a verruga é um tumor benigno) até carcinomas, como os do colo do útero. Muito já se conhece sobre a biologia molecular da malignidade dos vírus do papiloma; por exemplo, o vírus tipo 16 (provavelmente, outros também) contém os genes *E6* e *E7* que codificam as proteínas pE6 e pE7. A proteína pE6 se prende à proteína p53, codificada por um proto-oncogene, impedindo sua ação protetora sobre o DNA. A proteína pE7 se prende à proteína pRB, neutralizando essa proteína supressora de tumores. Assim, as proteínas E6 e E7 codificadas pelo DNA viral fazem as células entrarem no ciclo mitótico (pelo bloqueio de pRB) e danificam os mecanismos de proteção do DNA proporcionados por p53.

O vírus Epstein-Barr é muito complexo, com genoma de DNA constituído por 100 a 200 kb. Esse vírus é responsável por uma doença chamada mononucleose infecciosa e é um fator que favorece o aparecimento do linfoma (tumor do tecido linfático) de Burkitt e de outros tumores.

Doenças dos vegetais (pragas) causadas por vírus são muito comuns

Os vírus produzem muitas doenças nos vegetais, causando graves prejuízos à agricultura. Dentre essas doenças, podem ser mencionadas, como exemplos: o mosaico da berinjela, a tristeza do *Citrus*, a faixa clorótica das nervuras do milho e outras (Figura 17.11).

Os viroides não apresentam capsômeros: são constituídos apenas por uma molécula de ácido nucleico

O primeiro viroide foi descoberto ao se procurar identificar e isolar o agente causador de uma moléstia de batata (doença do tubérculo afilado) e que se supunha ser um vírus. Observou-se que essa doença é causada por um agente constituído exclusivamente por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA), medindo 50 nm, não associado a proteína e que não forma par-

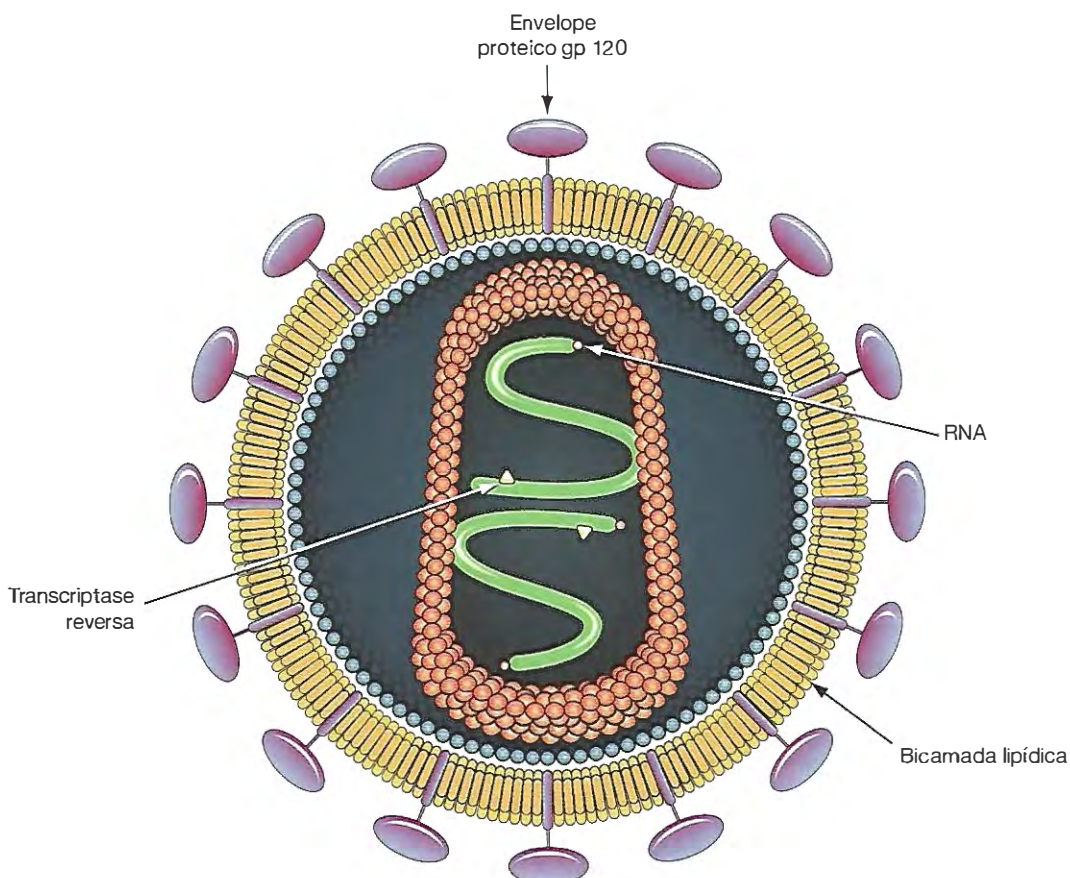



Figura 17.10 ▪ Vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV). Modelo esquemático.

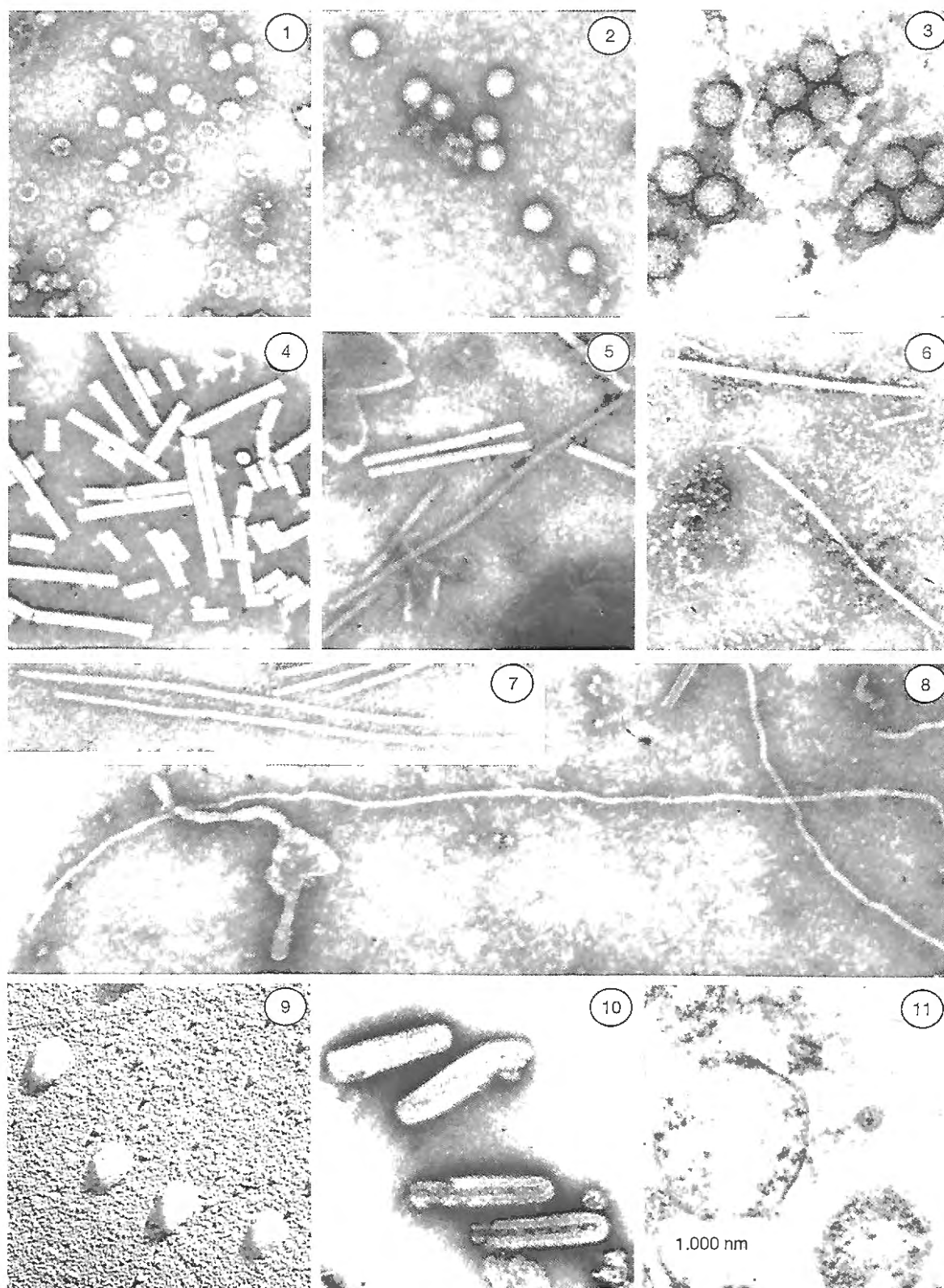



Figura 17.11 ▪ Exemplo de vírus que causam doenças nos vegetais. **1.** Mosaico da berinjela (30 nm). **2.** Mosaico de *Mirabilis* (50 nm). **3.** Nanismo da Pangola (70 nm). **4.** Anel do pimentão (200 × 25 nm). **5.** Mosaico do tabaco (300 × 20 nm). **6.** Mosaico comum da mandioca (500 × 15 nm). **7.** Mosaico-em-faixa da cebola (760 × 15 nm). **8.** Tristeza do Citrus (2.000 × 10 nm). **9.** Vira-cabeça (90 nm). **10.** Faixa clorótica das nervuras do milho (300 × 70 nm). **11.** Micoplasma do superbrotamento da mandioca (1.000 nm), incluído para comparação. **1** a **9,** micrografias eletrônicas com coloração negativa. **10,** micrografia eletrônica com sombreamento. **11,** micrografia eletrônica de corte de tecido vegetal. (Cortesia do Dr. E. W. Kitajima.)

tículas virais completas. Esse tipo de agente patógeno foi denominado viroide, e logo se verificou que outras doenças vegetais também são causadas por viroides. É possível que determinadas doenças dos animais também sejam produzidas por viroides.

Os viroides até hoje descobertos são pequenas moléculas circulares de RNA com apenas 250 a 400 pares de bases. Esse RNA circular ocorre em filamento simples, mas as ligações entre bases, localizadas nas duas metades da molécula, confere ao RNA dos viroides a forma de uma estrutura em bastão. Nos organismos parasitados, os viroides se localizam, de preferência, e talvez exclusivamente, no interior dos núcleos celulares, em íntima associação com a cromatina.

O mecanismo de multiplicação dos viroides ainda é desconhecido, sendo difícil explicar, à luz dos conhecimentos atuais, como uma molécula tão pequena de RNA consegue induzir sua multiplicação nas células parasitadas. O RNA do viroide mais bem conhecido tem peso molecular suficiente para atuar como mensageiro na codificação de uma molécula proteica com apenas 70 a 80 aminoácidos. É, portanto, incapaz de codificar as unidades proteicas que constituem a RNA-polimerase dependente de RNA. Embora os viroides não codifiquem proteínas enzimáticas, há algumas evidências de que o próprio RNA desses genes móveis tenha atividade catalítica, atuando como uma ribozima.

Resumo

Os vírus são estruturas constituídas por um genoma de DNA ou de RNA, sem capacidade de multiplicação independente e que dependem das organelas celulares para sua proliferação. Eles não são capazes de utilizar energia nem apresentam a maquinaria necessária para a síntese de suas próprias moléculas e, por isso, são parasitos intracelulares obrigatórios, causando muitas doenças nos animais e nas plantas.

A afinidade entre moléculas virais e moléculas da superfície das células determina as células que podem ser invadidas por cada tipo de vírus. Assim, distinguem-se os vírus bacterianos ou bacteriófagos, que têm afinidade pelas bactérias; os vírus animais, com afinidade pelas células animais; e os vírus vegetais, que têm afinidade pelas células das plantas.

Estruturalmente, a partícula viral completa, extracelular, ou vírion, consiste no genoma de RNA ou de DNA, envolvido pelo capsídio que protege o genoma e possibilita a aderência e penetração nas células. O capsídio é formado por subunidades proteicas, os capsômeros. Em alguns casos, o vírion apresenta um invólucro lipoproteico que envolve externamente o capsídio. Esse invólucro é constituído por uma bicamada de fosfolipídios derivados do sistema celular de membranas e por proteínas codificadas pelo genoma viral.

O capsídio de muitos vírus tem uma forma geométrica. Os capsômeros podem dispor-se em hélice, na simetria helicoidal, ou então constituindo uma estrutura com 20 lados triangulares e iguais, na simetria icosaédrica. Nos dois casos, o tamanho do capsídio é proporcional ao tamanho da molécula de ácido nucleico do genoma do vírus.

Ao contrário das células que crescem e se dividem, os vírus proliferam diretamente do seu genoma que controla a síntese dos componentes virais, e estes se agregam automaticamente, sem consumo de energia, em um processo de montagem.

Nos laboratórios de pesquisa e de produção de vacinas, os vírus geralmente são cultivados em culturas de bactérias e de células animais ou vegetais, ou então em anexos embrionários de aves, geralmente a membrana corioalantoide de embriões de galinha.

Os viroides são ainda mais simples do que os vírus, pois consistem exclusivamente no genoma de RNA, sem qualquer envoltório protetor e sem moléculas que facilitem a penetração nas células. Muitas doenças das plantas são causadas por viroides.

Bibliografia

Diener, T.D.: Viroids. *Sci. Amer.*, **244**:66, 1980.

Fields, B.N. and Knipe, D.M. (eds.): *Fundamental Virology*, 3rd ed. Raven, 1990.

Gallo, R.C.: The first human retrovirus. *Sci. Amer.*, **235**(Dec.):88, 1986.

Karp, G.: The cell and molecular biology. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. 2010

Levine, A.: *Viruses*. Scient. Amer. Library, 1992.

Levy, J.A., Fraenkel-Conrat, H. and Owens, R.: *Virology*, 3rd ed. Prentice-Hall, 1994.

Mann, J.M. and Tarantola, D.J.M.: HIV 1998: The global picture. *Sci. Amer.*, **279**(1):62, 1998.

Biologia Celular e Molecular

Junqueira & Carneiro

Totalmente renovado!

O clássico *Biologia Celular e Molecular* chega à nona edição totalmente renovado, e não apenas no aspecto gráfico: todos os capítulos foram minuciosamente revisados e atualizados com base nas mais recentes pesquisas; novas micrografias eletrônicas foram adicionadas, e todos os desenhos foram refeitos e aperfeiçoados.

Algumas das muitas novidades desta edição

- Mais detalhes sobre a origem e o crescimento da parede das células vegetais
- Novas informações sobre a penetração de macromoléculas proteicas nos plastos
- Textos atualizados sobre as moléculas que participam da fotossíntese
- Proteínas recentemente descobertas que participam do retículo endoplasmático
- Novos tópicos sobre as proteínas das membranas dos lisossomos
- Especificação das proteínas do envoltório nuclear
- Envelopatias (distúrbios decorrentes de mutações nas proteínas do envelope nuclear)
- Descrição dos compartimentos ou domínios nucleares
- Mais informações sobre células-tronco
- Mais conteúdo sobre os fatores que controlam o ciclo celular.

www.grupogen.com.br
http://gen-io.grupogen.com.br